

Stabilität des Duck Hepatitis B Virus (DHBV) gegenüber Desinfektionsmitteln im Vergleich zu Vacciniavirus

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Uwe Bust

geboren am 11. November 1962 in Mühlhausen

Gutachter

- 1. Prof. Dr. med. Pfister, Jena**
- 2. Prof. Dr. med. Rabenau, Frankfurt**
- 3. Prof. Dr. med. Sauerbrei, Jena**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.07.2014

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Hospitalinfektionen unter besonderer Berücksichtigung von virusbedingten Erkrankungen	3
2.2. Widerstandsfähigkeit von Viren gegenüber chemischen Agenzien	6
2.3. Wirkstoffe zur Virusdesinfektion	9
2.3.1. Aldehyde	9
2.3.2. Alkohole	11
2.3.3. Peroxisäuren	12
2.4. Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Viruzidie	14
2.5. Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Wirkung gegenüber dem Hepatitis B-Virus	19
2.6. Aufgabenstellung	22
3. Material und Methoden	23
3.1. Zellkultur	23
3.2. Virus	24
3.3. Desinfektionsmittel	25
3.4. Polymerasekettenreaktion zum qualitativen Nachweis von Duck Hepatitis B Virus-DNA	27
3.4.1. DNA-Präparation	27
3.4.2. Virus-DNA-Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion	28
3.4.3. Darstellung der viralen DNA mittels Agarosegelelektrophorese	30

3.5.	Quantitativer Suspensionsversuch	33
	3.5.1. Versuchsdurchführung	33
	3.5.2. Viruskontrolle	34
	3.5.3. Bestimmung der Zytotoxizität	34
3.6.	Immunfluoreszenztest zum Nachweis der Duck Hepatitis B Virus-Antigene	35
3.7.	Rezepturen der verwendeten Lösungen und Nährmedien	38
3.8.	Statistische Analyse	40
3.9.	Testung der Desinfektionsmittel gegenüber Vaccinia- virus und Modified Vaccinia Virus Ankara	41
4.	Ergebnisse	42
4.1.	Hepatozytotoxizität der getesteten Desinfektions- mittel	42
4.2.	Einzelergebnisse zur begrenzten Viruzidie der getesteten Desinfektionsmittel gegenüber dem Duck Hepatitis B Virus	45
4.3.	Mittlere Reduktionsfaktoren der begrenzten Viruzidie der getesteten Desinfektionsmittel gegenüber dem Duck Hepatitis B Virus	56
4.4.	Mittlere Reduktionsfaktoren der begrenzten Viruzidie der getesteten Desinfektionsmittel gegenüber dem Vacciniavirus und dem Modified Vaccinia Virus Ankara	60
4.5.	Direkter Vergleich der begrenzten Viruzidie der getesteten Desinfektionsmittel gegenüber dem Duck Hepatitis B Virus sowie dem Vacciniavirus bzw. dem Modified Vaccinia Virus Ankara	64

5. Diskussion **70**

6. Schlußfolgerungen **83**

7. Literaturverzeichnis

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

Danksagung

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

A. bidest.	Aqua bidestillata
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DHBs-Ag	Duck Hepatitis B Virus Surface Antigen
DVV	Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V.
FKS	Fetales Kälberserum
HBV	Hepatitis B-Virus
HBs-Ag	Hepatitis B Surface Antigen
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
log ₁₀ CD ₅₀	logarithmische zytotoxische Dosis bei 50% Zytotoxizität
MVA	Modified Vaccinia Virus Ankara
mRF	mittlerer Reduktionsfaktor
PBS	Phosphate-buffered Saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMV	Poliomyelitisvirus
PPSB	Prothrombin, Prokonvertin, Stuart-Prower-Faktor, antihämophiler Faktor B (Prothrombinkonzentrat)
RF	Reduktionsfaktor
RKI	Robert Koch-Institut
RSV	Respiratory Syncytial Virus
SV40	Simian Virus 40
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose 50%

1. Zusammenfassung

Die Vermeidung von Hospitalinfektionen hat einen außerordentlich hohen Stellenwert in allen modernen Gesundheitssystemen. Grundlage des Hygieneregimes zur Unterbrechung von Infektketten ist die Anwendung von wirksamen Desinfektionsmitteln. Besonders kritisch gesehen werden die Desinfektionsmaßnahmen zur Vermeidung von Hepatitis B-Virus (HBV)-Infektionen. Bereits Kontaminationen mit geringsten Blutmengen bei hoher Viruslast des Trägers können zur Infektion führen. Da Viren ein sehr unterschiedliches Resistenzverhalten gegenüber chemischen Substanzen haben, ist für jedes Desinfektionsmittel der Nachweis der Viruswirksamkeit zu erbringen. Die Prüfung des HBV wird insbesondere dadurch erschwert, dass es in herkömmlichen Zellkulturen nicht angezüchtet werden kann. Die Testung von Desinfektionsmitteln für die Deklaration „begrenzt viruzid“ für umhüllte Viren, zu denen auch das HBV gehört, erfolgt daher unter Verwendung der Testviren Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) und Vacciniavirus bzw. Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA). Das Duck Hepatitis B Virus (DHBV) ist international anerkannt als Surrogatvirus zur Testung auf Viruzidie gegenüber HBV.

In der vorliegenden Arbeit sollte die viruzide Wirkung von in der medizinischen Praxis häufig angewandten Desinfektionsmitteln gegenüber DHBV bestimmt und mit publizierten Daten zur Viruzidie von Vacciniavirus/MVA verglichen werden. Unterschiede in der Empfindlichkeit von DHBV und Vacciniavirus/MVA gegenüber den Prüfsubstanzen würden die Verwendung von DHBV als weiteres Modellvirus zur Testung von Desinfektionsmitteln für den Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“ erfordern.

Die Viruzidietestung wurde im Suspensionstest nach der Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) und des Robert Koch-Instituts (RKI) durchgeführt. Das DHBV wurde von kongenital infizierten Peking-Enten gewonnen und in primären embryonalen Entenhepatozyten vermehrt. Die Bestimmung des Infektionstiters nach Einwirkung des Desinfektionsmittels erfolgte durch die Markierung der Duck Hepatitis B Virus Surface Antigen (DHBs-Ag)-exprimierenden Zellen mittels indirektem Immunfluoreszenztest. Getestet wurden

Alkohole (Ethanol und Isopropanol), Aldehyde (Glutardialdehyd und Formaldehyd) und Persäuren (Peressigsäure) in unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten.

Die eigenen Ergebnisse und die publizierten Daten für Vacciniavirus/MVA zeigen, dass die Inaktivierung von DHBV und Vacciniavirus/MVA durch 40% Ethanol innerhalb von 2 min und durch 40% Isopropanol innerhalb von 1 min weitgehend übereinstimmt. Während 0,01% Peressigsäure DHBV innerhalb von 2 min inaktivierte, war eine viruzide Wirkung gegen Vacciniavirus/MVA bereits bei einer Konzentration von 0,005% innerhalb von 1 min festzustellen. Glutardialdehyd in einer Konzentration von 0,05% zeigte nach der Einwirkzeit von 2 min eine vergleichbare viruzide Wirkung gegenüber DHBV und Vacciniavirus/MVA. Gegen Formaldehyd 0,7% verhielten sich DHBV und Vacciniavirus/MVA etwa gleich, eine Titerreduktion von $\geq 4,00 \log_{10}$ -Stufen konnte jedoch nicht ermittelt werden, da die hepatozytotoxischen Effekte dieser Substanz die Bestimmung des Reduktionsfaktors (RF) einschränkte.

Die Untersuchungen zeigen, dass DHBV und Vacciniavirus/MVA eine vergleichbare Stabilität gegenüber Ethanol, Isopropanol, Peressigsäure und Glutardialdehyd sowie Formaldehyd aufweisen, und dass die Modellviren durch relativ niedrige Konzentrationen der Prüfsubstanzen innerhalb kurzer Einwirkzeiten inaktiviert werden.

Aus den Untersuchungen kann geschlossen werden, dass DHBV und Vacciniavirus/MVA eine vergleichbare Tenazität besitzen. Damit kann davon ausgegangen werden, dass Desinfektionsmittel, die gegen Vacciniavirus/MVA wirken, zuverlässig auch DHBV inaktivieren. Somit kann bei der Desinfektionsmittelprüfung die Testung gegenüber DHBV entfallen.

2. Einleitung

2.1. Hospitalinfektionen unter besonderer Berücksichtigung von virusbedingten Erkrankungen

Die Vermeidung von Hospitalinfektionen hat einen außerordentlich hohen Stellenwert in allen modernen Gesundheitssystemen erlangt. Potenziell pathogene Bakterien, Pilze und Viren kommen zwar überall in der Umwelt vor, für gesunde Personen, die mit ihnen in Kontakt kommen, hat dies jedoch meist keine Folgen. Anders ist die Situation in Krankenhäusern, wo geschwächte, ältere oder chronisch kranke Menschen auf Infektionserreger treffen können, die sich im Krankenhausmilieu besonders gut ausbreiten bzw. deren Übertragung durch engen Kontakt oder invasive diagnostische und therapeutische Verfahren erfolgt.

Aktuelle Daten des Robert Koch-Instituts (RKI) zeigen, dass rund 3,5% aller Patienten während des Krankenhausaufenthaltes (RKI 2012a) eine Infektion erleiden. Es handelt sich dabei in den meisten Fällen um Bakterien, häufig um multiresistente Erreger. Eine 1998 veröffentlichte Prävalenzstudie in ausgewählten 72 deutschen Krankenhäusern fand, dass im stationären Bereich am häufigsten Harnwegsinfektionen (42%), beatmungsassoziierte Pneumonien (21%) und postoperative Wundinfektionen (16%) erworben werden (Gastmeier et al. 1998). Die Infektionsrate war am höchsten bei Patienten auf Intensivstationen (15%), gefolgt von Patienten der Chirurgie (4%), und der Allgemeinmedizin (3%) (Gastmeier et al. 1998).

Nosokomiale Virusinfektionen werden meist nur bei Ausbrüchen von respiratorischen oder gastrointestinalen Infektionen wahrgenommen (Mlinaric-Galinovic und Varda-Brkic 2000). In Industrieländern wie den USA geht man davon aus, dass 2-10% aller Hospitalinfektionen durch Viren verursacht werden (Wright und Bieluch 1993), die zu einer um etwa 10 Tage verlängerten Krankenhausbehandlung führen. Die Rate nosokomialer Virusinfektionen ist in der Pädiatrie mit einem Anteil von 50% am höchsten. In anderen stationären Bereichen werden bis zu 5% aller nosokomialen Infektionen durch Viren verursacht (Wolff 1992).

Die häufigste Ursache nosokomialer Infektionen bei Säuglingen und jungen Kleinkindern sind Respiratory Syncytial Viren (RSV), die während der Wintermonate

in der Bevölkerung regelmäßig zu Ausbrüchen führen. Überträger im Krankenhaus sind Patienten oder auch asymptomatische bzw. symptomarme Infizierte unter dem Personal oder den Besuchern. In den 1960er und 1970er Jahren betrug die Häufigkeit nosokomialer RSV-Infektionen auf Neugeborenenstationen weltweit 30-70% (Mlinaric-Galinovic und Varda-Brkic 2000). Durch entsprechende Hygienemaßnahmen konnten diese Infektionen deutlich reduziert werden (Madge et al. 1992).

Eine große Rolle spielen auch gastrointestinale Infektionen durch hochkontagiöse Viren wie Rota- und Noroviren. Studiendaten für Deutschland, Österreich und die Schweiz zeigen, dass bei Kindern mit nosokomialer Gastroenteritis in 49-69% der Fälle eine Rotavirusinfektion zugrunde lag (Frühwirt et al. 2001, Ogilvie et al. 2012). In England und Wales wurden durch ein Surveillance-System von 1992 bis 2000 mehr als 5.000 Ausbrüche von Gastroenteritis registriert, von denen jeweils 27-28% in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen auftraten (Meakins et al. 2003, Lopman et al. 2003, 2005). Mehr als 50% dieser Ausbrüche waren durch das Norovirus bedingt, für weitere 25% wurden andere, nicht durch Laboruntersuchungen bestätigte Erreger verantwortlich gemacht. Nach Schätzungen hat ein Patient bei einem Krankenhausaufenthalt von 7 Tagen ein 1,5%iges Risiko, sich mit Noroviren zu infizieren (Lopman et al. 2004). Das Infektionsrisiko für das Pflegepersonal wird mit 17% pro Jahr angegeben.

Während der Influenzasaison können auch Hospitalinfektionen durch Influenzaviren auftreten, die besonders für ältere Menschen und immungeschwächte Patienten gefährlich sind, da bei ihnen der Impfschutz nicht optimal ausgeprägt ist und schwere Krankheitsverläufe keine Seltenheit sind. Für Seniorenheime ist bestätigt, dass die Infektion häufig vom Pflegepersonal ausgeht (Mukerjee 1994). Infektketten lassen sich jedoch kaum nachweisen.

Ausbrüche in der Bevölkerung sind auch Ausgangspunkt für Hospitalinfektionen durch Adenoviren der Typen 8, 19 und 37, die die Keratokonjunktivitis epidemica verursachen. Infolge der hohen Kontagiosität besteht eine erhöhte Gefahr der Übertragung in augenärztlichen Ambulanzen und Kliniken (Gottsch 1996).

Hospitalinfektionen durch das HBV haben wegen der schwerwiegenden Folgen seiner Erkrankung einen besonderen Stellenwert. Das Virus gehört zu den weltweit

häufigsten Infektionserregern, an dessen Folgen jährlich etwa 0,6 bis 1 Millionen Menschen versterben (Perz et al. 2006, WHO 2013). Im Rahmen des 1998 in Deutschland durchgeführten Bundesgesundheits surveys wurde bei 7% der Gesamtbevölkerung anhand eines serologischen Markers eine durchgemachte oder aktuelle HBV-Infektion nachgewiesen (Thierfelder et al. 2001). Circa 0,6% dieser Personen waren Hepatitis B Surface Antigen (HBs-Ag) positiv, d.h. bei ihnen bestand eine aktive HBV-Infektion. In bestimmten Risikogruppen und bei aus Gebieten mit sehr hoher Seroprävalenz stammenden Personen sind HBs-Ag-Träger wesentlich häufiger.

Effektive Impfmaßnahmen haben die Zahl der berufsbedingten HBV-Infektionen stark reduziert. Das Risiko, bei der Übertragung von Blut oder Blutprodukten mit HBV infiziert zu werden, wurde durch sensitive Laboruntersuchungen bei der Spenderauswahl ebenfalls minimiert. Die Gefahr einer unerkannt infektiösen Blutspende in Deutschland wird auf ca. 1/360.000 geschätzt (Hourfar et al. 2008; Stramer et al. 2011). Nach Einführung sicherer Inaktivierungsverfahren und der Testung der Plasmapools auf HBV-DNA sind auch Plasmaderivate, insbesondere Faktor XIII, IX oder Prothrombinkonzentrat (PPSB), als virussicher zu betrachten (Offergeld 2006; RKI 2012a; 2012b).

Dass Hepatitis-B-Ausbrüche in medizinischen Einrichtungen auch unter den derzeit hohen hygienischen Standards in hochentwickelten Industrieländern noch ein ernstes Problem sind, zeigt eine systematische Literaturrecherche. Ausgewertet wurden Berichte aller von infizierten Patienten ausgehenden Hepatitis-B-Ausbrüche zwischen 1992 und 2007 in Europa und den USA (Lanini et al. 2009). Die Autoren fanden 33 Ausbrüche mit 471 Patienten, von denen 16 verstarben. Auf Dialyse-Einheiten entfielen 30% der Ausbrüche, gefolgt von internistischen Stationen (21%), Pflegeheimen (21%), chirurgischen Stationen (15%) sowie ambulanten Einrichtungen (12,1%). Infektionsquelle waren HBV-infizierte Patienten. Verursacht wurde die Übertragung meist durch Verletzungen des Hygieneregimes.

Eine der tragenden Säulen des Hygieneregimes zur Verhinderung nosokomialer Infektionen ist der Einsatz von Desinfektionsmitteln. Für die Vermeidung von HBV-Infektionen sind geeignete Desinfektionsmaßnahmen unerlässlich, da bereits geringste Mengen an kontaminiertem Blut bei hoher Viruslast des Trägers zu Infektionen führen können. Ein Beleg für die hohe Infektionsgefahr durch HBV ist,

dass selbst nicht mehr sichtbare Verunreinigungen mit Blut noch eine Hepatitis-B Viruslast von 10^2 bis 10^3 infektiösen Partikeln enthalten können (Favero und Bolyard 1995).

2.2. Widerstandsfähigkeit von Viren gegenüber chemischen Agenzien

Die verschiedenen Virusgruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Widerstandsfähigkeit (Tenazität) gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen, wofür die Beschaffenheit der Virusoberfläche von entscheidender Bedeutung ist (Klein und Deforrest 1963). Behüllte Viren sind von einer lipidhaltigen „Envelope“ umgeben, in die Proteine eingelagert sind. Unbehüllte Viren besitzen ein stabiles proteinhaltiges Nukleokapsid, das sie gegen Umwelteinflüsse relativ widerstandsfähig macht. Unter diesen nackten Viren gibt es auch Vertreter, die mit Lipiden reagieren (Prince et al. 1991). In Abhängigkeit von der Lipidbindungsfähigkeit der Virusoberfläche kann eine Einteilung in die 4 Gruppen vorgenommen werden (Rheinbaben und Wolff 1991; Rabenau und Schwebke 2010; Prince et al. 1991):

- behüllt, lipophil: z.B. Hepatitis C-Virus (HCV), Herpesviren, Retroviren
- behüllt, schwach lipophil: z.B. HBV, Pockenviren
- unbehüllt, schwach lipophil: z.B. Adenoviren, Rotaviren, Noroviren
- unbehüllt, hydrophil: z.B. Hepatitis A-Virus, Picornaviren, Parvoviren

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die medizinisch relevanten humanpathogenen Viren in Bezug auf Virushülle und Übertragungswege. In der Regel nimmt die Empfindlichkeit von Viren gegenüber Desinfektionswirkstoffen mit Zunahme der hydrophilen Eigenschaften ab. Allerdings können auch behüllte Viren eine ähnlich hohe Widerstandsfähigkeit aufweisen wie nackte Viren. Wesentlich für die Wirksamkeit chemischer Desinfektionsstoffe ist ihr Reaktionsvermögen mit den lipophilen Komponenten der Virusoberflächen. Im Allgemeinen gilt, je höher der Lipidgehalt, umso leichter kann ein Virus durch lipophile Desinfektionsmittel inaktiviert werden.

Die Wirkungsweise der Desinfektionsstoffe ist im Einzelnen noch nicht genau untersucht. Angriffspunkte für chemische Agenzien zur Virusinaktivierung sind die äußere Hülle, das Nukleokapsid und die Nukleinsäure der Viren. Dabei spielen Proteinmodifikationen, Änderung der Ladung, Hydrolyse, Oxidation, Alkylierung und andere chemische Reaktionen eine Rolle.

Die viruzide Wirksamkeit der Desinfektionsstoffe wird von verschiedenen äußeren Faktoren beeinflusst, wie der Fähigkeit zur Bildung von Aggregaten, der Art und Menge von Begleitmaterialien (z.B. Blut, Serum), der Bindung der Partikel an Oberflächen, dem pH-Wert und der Temperatur (Jülich et al. 1993). Sehr unterschiedlich können sich Blutbelastungen auf Reaktionsfähigkeit der Wirkstoffe auswirken. So wird die Wirksamkeit von Formaldehyd durch Blutbeimengungen verstärkt, die von Aktiv-Sauerstoff freisetzenden Substanzen (z.B. Peressigsäure) stark abgeschwächt (Jülich et al. 1990).

Tab.1: Übersicht über humanmedizinisch relevante und bei Desinfektionsmaßnahmen potenziell zu berücksichtigende Viren (Arbeitskreis Viruzidie 2004)

Virus	Be- hüllt	Unbe- hüllt	Hautübertragungsweg				Impfung
			Kontakt	Tröpfchen	Blut	Bemerkung	
Adenoviridae		+	+	+	+		
Astroviridae		+	+				
Caliciviridae							
• Norovirus		+	+	+			
• Sapovirus		+	+				
• Hepatitis-E-Viren (HEV)		+	+				
Coronaviridae (einschließlich SARS-assoziierte Coronaviren)	+		+	+			
Flaviviridae							
• Hepatitis-C-Viren (HCV)	+		+ ^a		+		
• Gelbfiebertvirus	+					Möglichk. der nosokom. Übertrag.unbek.	+
Hepadnaviridae							
• Hepatitis-B-Viren (HBV)	+		+ ^a		+		+
Herpesviridae							
• Herpes-simplex-Virus (HSV-1,2)	+		+				
• Varicella-Zoster-Virus (VZV)	+		+	+			+
• Cytomegalievirus (CMV)	+		+		+		
• Epstein-Barr-Virus (EBV)	+		+		+		
• Humanes Herpesvirus-6,7 (HHV-6,7)	+		+				
• Humanes Herpesvirus-8 (HHV-8)	+		+				
Orthomyxoviridae							
• Influenzavirus (A+B)	+		+	+			+
Papovaviridae							
• Polyomavirus (SV40)		+	+				
• Papillomavirus (Warzenvirus)		+	+				
Paramyxoviridae							
• Masernvirus	+		+	+			+
• Mumpsvirus	+		+	+			+
• Parainfluenzavirus	+		+	+			
• Respiratory Syncytial Virus (RSV)	+		+	+			
Parvoviridae							
• Parvovirus B-19		+	+	+	+		
Picornaviridae							
• Hepatitis-A-Viren (HAV)		+	+				+
• Poliovirus		+	+	+			+
• Coxsackievirus		+	+	+			
• ECHO-Virus		+	+	+			
• Rhinovirus		+	+	+			
Poxviridae							
• Molluscum contagiosum	+		+				
Reoviridae							
• Rotavirus		+	+				
Retroviridae							
• Humanes Immundefizienzvirus (HIV)	+		+ ^a		+		
• Humanes T-Zell-Leukämievirus (HTLV)	+		+ ^a		+		
Rhabdoviridae							
• Tollwutvirus	+					Selten von Mensch zu Mensch	+
Togaviridae							
• Rötelnvirus	+		+	+			
Geringes, eingeschränktes bzw. unbekanntes Risiko der nosokomialen Übertragung							
• Virale Erreger des hämorrhagischen Fiebers, z.-B. Marburg-, Ebola-, Lassafieber, Hantavirus	+					Hauptübertragungsweg unbekannt	
• Frühsommer-Meningoenzephalitis-(FSME-)Virus	+					Möglichkeit der nosokomialen Übertragung z.T.belegt	
• Hepatitis-D-Viren (HDV)	+		+		+	Übertragungen nur mit HBV beschrieben	
^a Sexualkontakt							

^aSexualkontakt

2.3. Wirkstoffe zur Virusdesinfektion

Die meisten Desinfektionsmittel setzen sich aus unterschiedlichen Wirkstoffen zusammen. Zu den wichtigsten Wirkstoffgruppen, die zur Virusdesinfektion und Antiseptik Anwendung finden, gehören:

- Aldehyde,
- Alkohole und
- Persäuren.

2.3.1. Aldehyde

Aldehyde zählen zu den wirksamsten viruziden Desinfektionsstoffen. Bedeutung für die Desinfektion im medizinischen Bereich haben vor allem *Formaldehyd* (Methanal) sowie die Dialdehyde *Glutardialdehyd* und *Glyoxal*. Diese extrem reaktiven Verbindungen interagieren mit Proteinen, DNA und RNA, worauf die bakteriziden, sporoziden und viruziden Eigenschaften beruhen. Untersuchungen mit dem Simian Virus 40 (SV40) zeigen, dass nur Aldehyde mit der Fähigkeit zum Protein-DNA-Crosslinking (Vernetzung) das Virusgenom inaktivieren können. Es wird angenommen, dass durch diesen Vorgang entweder die DNA-Polymerase oder der gesamte Replikationskomplex blockiert wird (Permana und Snapka 1994). In geringem Maße findet auch eine Reaktion mit den Proteinmolekülen des Kapsids statt, was dazu führt, dass die Durchlässigkeit für Aldehyde ins Innere der Viruspartikel abnimmt (Jülich et al. 1993). Formaldehyd und Glutardialdehyd sind biologisch voll abbaubar und somit sehr gut umweltverträglich.

Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe, Formaldehyd (Methanal), ist eine extrem reaktive Chemikalie, die im reinen Zustand als ein farbloses, stechend riechendes Gas vorliegt. Die handelsübliche Zubereitung ist Formalin, eine 35-37%ige wässrige Formaldehydlösung, der zur Stabilisierung 10% Methanol beigesetzt ist. In der Industrie wird Formaldehyd in vielfältiger Weise verwendet, wie z.B. als Ausgangsstoff für zahlreiche chemische Verbindungen oder als Konservierungsmittel. Die Anwendungsmöglichkeiten als Desinfektionsmittel sind durch den unangenehmen Geruch und das Verursachen von Kontaktallergien eingeschränkt. Im gasförmigen Zustand wird Formaldehyd zur Desinfektion von

medizinischen Geräten und kontaminierten Gegenständen sowie zur Raumdesinfektion verwendet. Formaldehyd hat eine hohe viruzide Wirksamkeit, die allerdings relativ langsam eintritt. So ist für die Inaktivierung von Poliomyelitisviren (PMV) im Suspensionstest bei Anwendung einer 1%igen Formaldehydlösung die Einwirkungszeit von 1 Stunde erforderlich, mit einer 0,1%igen Lösung wird der gleiche Effekt in 8 h erzielt (Jülich et al. 1993). Formaldehyd wirkt innerhalb eines breiten pH-Bereiches von 3-10 und bleibt auch in Gegenwart von Blut wirksam (Jülich et al. 1990). Als Bestandteil zahlreicher Flächen- und Instrumentendesinfektionsmittel ist dieser Wirkstoff unentbehrlich. Die Strukturformel von Formaldehyd ist in Abbildung 1 dargestellt.

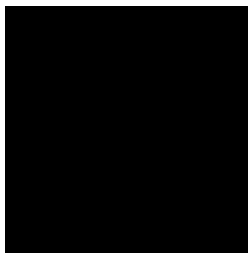


Abb. 1: Strukturformel von Formaldehyd

Die viruzide Wirksamkeit von Glutardialdehyd (Glutaral, Abb. 2) ist in hohem Maße pH-abhängig. Der Wirkstoff kann im alkalischen Bereich Viren effektiver inaktivieren als Formaldehyd, ist allerdings im sauren Bereich stabiler. Mit 2%igem Glutardialdehyd ließ sich eine Titerreduktion des PMV Typ 1 auf trockenen Oberflächen um mehr als 4,00 log₁₀-Stufen innerhalb von 1 min erreichen (Tyler et al. 1990). Glutardialdehyd reagiert durch Quervernetzungen sehr stark mit Proteinen, so dass bei dem Einsatz zur Instrumentendesinfektion eine Vorreinigung vorgenommen werden muss.



Abb. 2: Strukturformel von Glutardialdehyd

2.3.2. Alkohole

Von den Alkoholen werden vor allem Ethanol (Abb. 3) sowie n- und iso-Propanol (Abb. 4) zur Desinfektion eingesetzt. Ihre viruzide Wirksamkeit wird außer von der Lipophilie der Viruspartikel von der Temperatur und der Dielektrizitätskonstanten (Lipidlösungsverhalten) des betreffenden Alkohols bestimmt. Mit Erhöhung der Anwendungskonzentration steigt die viruzide Wirksamkeit. Behüllte Viren werden problemlos durch die genannten Alkohole inaktiviert. Unter Praxisbedingungen trifft das offenbar auch für HBV zu, wie Schimpansenversuche zeigten (Jülich et al. 1993). Eine begrenzt viruzide Empfindlichkeit zeigen die unbehüllten Viren, wie Adeno- und Rotaviren, mit schwach ausgeprägten lipophilen Eigenschaften. Auf Grund eines erhöhten Lipidlösungsvermögens wird mit langkettigen Alkoholen eine bessere Inaktivierung schwach lipophiler Viren erzielt. Demgegenüber werden hydrophile Viren, insbesondere Polioviren, durch kurzkettige Alkohole wie Methanol und Ethanol innerhalb der üblichen Zeiten inaktiviert (Rheinbaben und Wolff 2002).

Ethanol ist ein aliphatischer einwertiger Alkohol, der sich von dem Alkan Ethan ableitet und bei Raumtemperatur flüssig, farblos und leicht brennbar ist. Der Geruch ist charakteristisch. Ethanol weist ein großes Anwendungsspektrum auf. So wird Ethanol beispielsweise als Lösungsmittel, Desinfektionsmittel, in Lebensmitteln und Getränken, als Brennstoff, Frostschutzmittel, als Aroma und Duftstoff sowie als Ausgangsstoff für weitere Syntheseprodukte verwendet.

Die medizinische Anwendung der Alkohole besteht vordergründig als Desinfektionsmittel. Ethanol und Isopropanol sind in der Lage, rasch in Mikroorganismen einzudringen (Steuer und Lutz-Dettinger 1990). Nach Larson und Morton (1991) erfolgt die Wirkung gegen Viren durch Eiweißdenaturierung. In Konzentrationen von 70 bis 90% werden Coxsackie-Virus B1, Adenovirus Typ 2, Herpes-simplex-Virus, Vacciniavirus, Influenzavirus, PMV Typ 1 und Echovirus Typ 6

inaktiviert (Klein und Deforest 1963). Diese Alkohole wirken auch gegen das feline Calicivirus, das als Surrogatvirus für Noroviren dient (Malik et al. 2006).

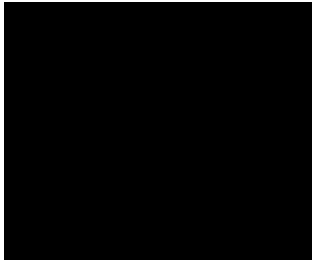


Abb. 3: Strukturformel von Ethanol

Isopropanol hat einen stechenden Geruch, der durch die verbreitete medizinische Anwendung charakteristisch ist. Isopropanol ist leicht flüchtig, brennbar und farblos. Angewandt wird Isopropanol hauptsächlich als Reinigungs- und Lösungsmittel, als Entschäumer und medizinisch als Desinfektionsmittel, die Herstellung erfolgt großtechnisch über Aceton oder Propen.

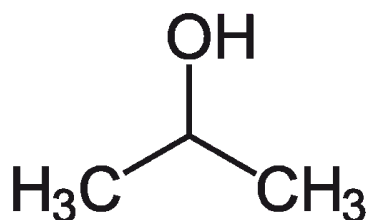


Abb. 4: Strukturformel von Isopropanol

2.3.3. Peroxisäuren

Peroxisäuren wirken wie H_2O_2 und Kaliumperoxomonophosphat als sogenannte "Aktivsauerstoff freisetzende" Substanzen stark viruzid. Von den Peroxisäuren wurden neben *Peressigsäure* vor allem Perzitronensäure und Perbernsteinsäure als Desinfektionsmittel erprobt. In der Praxis bewährt hat sich allerdings nur Peressigsäure, die als einer der effektivsten viruziden Wirkstoffe mit breitem Wirkungsspektrum seit mehr als 40 Jahren Anwendung findet (Wutzler et al. 1975; Mücke 1985; Sprössig und Mücke 1984, Sprössig 1989; Block 1991). Peressigsäure

wirkt auch bei niedrigen Temperaturen ($<10^{\circ}\text{C}$) schnell und zuverlässig in nur sehr geringen Gebrauchskonzentrationen. So werden bei Anwendungskonzentrationen von 0,02% im eiweißfreien Milieu innerhalb von 5-15 min behüllte und unbehüllte Viren inaktiviert. Im Suspensionsversuch unter Eiweißbelastung erfolgte die Inaktivierung von Adenovirus Typ 2 und PMV Typ 1 bei einer Peressigsäurekonzentration von 0,2% und der Einwirkungszeit von 15-30 min (Sauerbrei et al. 2004). In Versuchen zur Dekontamination von Gerätschaften in virologischen Laboratorien, die mit Reovirus 3, Parvoviren der Maus und aviären Polyomaviren kontaminiert waren, erwies sich die Vernebelung von Peressigsäure als wirksam (Gregerson und Roth 2012). In Kombination mit 80%igem Ethanol ist 0,2%ige Peressigsäure zur hygienischen Händedesinfektion geeignet (Wutzler und Sauerbrei 2000).

Peressigsäure ist ein sehr umweltfreundliches Produkt, das unter Freisetzung von hochreaktivem Sauerstoff zu Essigsäure und Wasser zerfällt. Der Vertrieb erfolgt in Konzentrationen von 2,5 und 40% als sogenannte Gleichgewichtsperoxyessigsäure. Beim Erhitzen zerfällt Peressigsäure explosionsartig durch die stark oxydierende funktionelle Gruppe. Vorsicht ist geboten durch die starke Reizung von Augen und Haut.

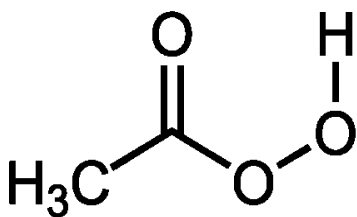


Abb. 5: Strukturformel von Peressigsäure

2.4 Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Viruzidie

Grundlegende Fragen der Prüfung und der Deklaration der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren werden in einer Stellungnahme des Arbeitskreises Viruzidie beim RKI sowie des Fachausschusses „Virusdesinfektion“ der DVV und der Desinfektionsmittelkommission der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) abgehandelt (Arbeitskreis Viruzidie 2004). So wird in Bezug auf die Unterscheidung der Desinfektionsmittel nach ihrer Wirksamkeit in

- „**begrenzt viruzid**“ als wirksam gegen behüllte Viren und
- „**viruzid**“ als zusätzlich wirksam gegen unbehüllte Viren

die folgende Begründung geliefert: „Diese Unterscheidung ist zweckmäßig, da die viruzide Wirksamkeit schwieriger zu erzielen, jedoch auch nicht in allen Fällen erforderlich ist. In Abhängigkeit vom Anwendungsbereich muss deshalb zunächst entschieden werden, welches Wirkungsspektrum die Desinfektionsmaßnahmen umfassen sollen. Durch dieses abgestufte Vorgehen soll eine sachgerechte und angemessene Desinfektion unter Berücksichtigung von Umweltbelastung und Verträglichkeit erzielt werden.“

Die von den genannten Expertengruppen ausgesprochenen Empfehlungen betreffen vor allem auch die Auswahl der Testviren für die Deklaration „begrenzt viruzid“ und „viruzid“. Wegen der Vielzahl humanpathogener Viren ist es nicht möglich, die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen die einzelnen Krankheitserreger direkt zu prüfen, so dass man sich auf repräsentative Testviren mit charakteristischen Eigenschaften beschränken muss. Entsprechend der Leitlinie der DVV und des RKI zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin (Blümel et al. 2008) werden in Deutschland zur Prüfung von Präparaten für die Hand-, Oberflächen- und Instrumentendesinfektion des Wirkungsbereichs „viruzid“ die in Tabelle 2 zusammengefassten Testviren eingesetzt.

Tab. 2: Testviren für die Prüfung und Deklaration von Desinfektionsmitteln entsprechend der Leitlinie DVV und des RKI zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin Fassung vom 1. August 2008 (Blümel et al. 2008)

Wirkungsbereich „viruzid“	Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“
<p>Vacciniavirus, Stamm Elstree¹</p> <p>Poliovirus-Impfstamm Typ 1, Stamm LScab</p> <p>Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75</p> <p>Polyomavirus² 2 (SV40), Stamm 777</p>	<p>Vacciniavirus, Stamm Elstree</p> <p>Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Stamm NADL</p>

¹Beschäftigte, die Versuche mit diesem Virus durchführen, sollten entsprechend geimpft sein.

²Alte Bezeichnung: Papovavirus SV40.

Für den Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“ erfolgt die Testung an Vacciniavirus (Stamm Elstree) und BVDV, Stamm NADL. Da das Laborpersonal zunehmend nicht mehr gegen Pocken geimpft ist, kann aus Gründen des Arbeitsschutzes das Vacciniavirus auch durch das MVA ersetzt werden (Rabenau und Schwebke 2010). Diese Testviren sollen den Rückschluss auf die Wirksamkeit auch gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV), HCV und HBV zulassen (Arbeitskreis Viruzidie 2004). Eine direkte Testung dieser mit Blut, Gewebe und Körperflüssigkeiten übertragbaren, behüllten Viren ist nicht möglich, da sie sich in konventionellen Zellkultursystemen entweder nicht replizieren (HBV, HCV) oder die Kultivierung zu gefährlich ist (HIV). Mit dem BVDV liegen umfangreiche Erfahrungen aus der Validierung von Inaktivierungsverfahren bei der Herstellung von Blut und Blutprodukten vor, die für den Einsatz als Testvirus für die Desinfektionsmittelprüfung sprechen (Environmental Protection Agency 2000).

Der Wirkungsbereich „viruzid“ wird an dem behüllten Vacciniavirus, Stamm Elstree und MVA sowie dem nicht behüllten Poliovirus-Impfstamm Typ I, Stamm LScab, dem nicht behüllten Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75 und dem nicht behüllten SV40, Stamm 777 geprüft.

Die Prüfverfahren zur Ermittlung der viruziden Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln in der Humanmedizin basieren auf einer gemeinsamen Richtlinie der DVV und des RKI aus dem Jahre 1982, die entsprechend neuer Erkenntnisse 2005 und 2008 aktualisiert wurde (Anonym 1982, 2005, Blümel et al. 2008). Der Grundgedanke der Richtlinie besteht darin, die viruzide Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels nur zu deklarieren, wenn es in der Lage ist, alle Modellviren zu inaktivieren. Desinfektionsmittelprüfungen werden nach einem standardisierten Verfahren zunächst im quantitativen Suspensionstest vorgenommen. Neben dieser nationalen Leitlinie wurde 2005 die europäische Norm DIN EN 14476 2007 eingeführt (Anonym 2007).

Konstante Testbedingungen schaffen die Voraussetzung für eine gute Reproduzierbarkeit der viruziden Effekte. Entscheidend für das jeweilige Anwendungsgebiet des Desinfektionsmittels ist die Überprüfung unter Praxisbedingungen, die z.B. das Verhalten von Viren im aggregierten Zustand oder auf porösen Oberflächen simulieren. Für diese Testbedingungen wurde kürzlich eine aktuelle Prüfmethode publiziert (Rabenau et al. 2012). Die verwendete

Virussuspension sollte mindestens einen Virustiter von 10^8 Tissue culture infective dose 50% (TCID₅₀) pro ml enthalten. Bei einigen Viren wie dem PMV Typ 1 können diese Konzentrationen schon nach Viruspassagierung in Zellkulturen erreicht werden. Bei anderen Viren wie z.B. dem MVA ist meist eine Viruskonzentrierung mittels Zentrifugation bei 40.000 x g erforderlich. Die im Bodensatz angereicherten Viren werden mit Phosphate-buffered Saline (PBS) versetzt und danach zur Entfernung des Zelldetritus erneut zentrifugiert. Entsprechend den Empfehlungen darf der Virustiter nur dann niedriger als 10^8 TCID₅₀/ml sein, wenn zweifelsfrei gewährleistet ist, dass eine Titerreduktion um 4,00 log₁₀-Stufen ablesbar ist.

Im Suspensionsversuch wird die notwendige Verdünnung der Desinfektionsmittel so eingestellt, dass die Desinfektionsmittelkonzentration um den Faktor 1,25 konzentrierter sein muss als die zu prüfende Konzentration. Die Virussuspension, der Belastungszusatz von fetalem Kälberserum (FKS), Aqua bidestillata (A. bidest.) und die Desinfektionsmittelverdünnung werden auf 20°C erwärmt. Ein Teil Virussuspension wird mit 1 Teil FKS bzw. A. bidest. gemischt. Danach werden 8 Teile Desinfektionsmittelverdünnung zugegeben und für die beabsichtigte Einwirkzeit bei 20±0,5°C gehalten. Die Bestimmung der Infektiosität erfolgt durch die Endverdünnungsmethode bzw. im Plaquetest. Eine mögliche Nachwirkung des Desinfektionsmittels wird durch Verdünnung oder Filtration bzw. Neutralisation verhindert. Zur Viruskontrolle wird der Titer der nicht mit Desinfektionsmittel versetzten Virussuspension mit oder ohne Kälberserumbelastung bestimmt. Für die Beurteilung der Desinfektionsmittelwirksamkeit wird der RF aus dem Infektiositätstiter log₁₀ TCID₅₀/ml vor (Viruskontrolle) und nach Desinfektionsmittel-Einwirkung mit einem 95% Konfidenzintervall errechnet.

Im Suspensionsversuch gelten diejenigen Konzentrationen eines Desinfektionsmittels als wirksam gegen Viren, die bei der jeweiligen Einwirkungsdauer den Titer an infektiösen Viren um mindestens 4 Zehnerpotenzen herabsetzen, was einem RF von $\geq 4,00$ log₁₀ entspricht. Die vorgegebenen Einwirkungszeiten liegen in der Regel zwischen 30 s und 1 h für Mittel zur Instrumenten- und Flächendesinfektion. Händedesinfektionsmittel müssen innerhalb von 30 bis 120 s die Testviren inaktivieren. In Praxistests wurden hierzu auch spezielle chirurgische Instrumente, z.B. endoskopisches Instrumentarium mit nur schwer zu reinigenden Innenteilen, evaluiert und die Wirksamkeit der Desinfektion

nach Kontamination mit DHBV nachgewiesen (Deva et al. 1996). Von einem Desinfektionsmittel wird idealerweise eine schnelle Virusabtötung, eine Nichttoxizität gegenüber den Menschen, ein nicht korrosives Verhalten gegenüber Instrumenten sowie eine praktikable und wirtschaftliche Anwendung erwartet (Murray et al. 1991). Aus den Ergebnissen von Suspensionsversuchen können Anwendungsempfehlungen für die Mittel nur in begrenztem Umfang abgeleitet werden. Derartige Wirkungsbedingungen, wie sie in einer homologen Suspension herrschen, liegen in der Anwendungspraxis meist nicht vor (Blümel et al. 2008). Aus diesem Grunde wurde 2012 eine nationale Leitlinie zur „qualitativen Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf nicht porösen Oberflächen“ entwickelt (Rabenau et al. 2012). Diese Leitlinie beschreibt das Prüfverfahren unter simulierten praktischen Verhältnissen. So wurden Einwirkzeiten, Konzentrationen und Temperatur praxisrelevant gewählt und auch Einflussfaktoren auf die Desinfektionsmittel-Wirksamkeit berücksichtigt. Methodische Einflüsse auf die Tenazität durch die verwendeten Zellen, Passagezahl, Zytotoxizität und die verwendeten Testviren wurden vermieden. Biometrische Aspekte sind berücksichtigt um sicherzustellen, dass die ermittelten RF auch die „wahre Wirksamkeit“ widerspiegeln.

2.5 Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Wirkung gegenüber Hepatitis B-Virus

Eine Sonderstellung bei der Bewertung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln nimmt das HBV ein, da z.Z. keine validierbare Prüfmethode zur Bestimmung der Infektiosität des Virus zur Verfügung steht (Arbeitskreis Blut 2000). Zu Beginn der Hepatitis B-Forschung waren Schimpansen-Versuche die Methode der Wahl für die zuverlässige Einschätzung der Wirkung von Desinfektionsmitteln (Prince et al. 1993). Aus Gründen des Tierschutzes und des immensen Aufwandes verbieten sich heute derartige Versuche, so dass nach Alternativen gesucht werden muss.

Um die Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Infektiosität des HBV zu umgehen, hat man in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene indirekte Testmethoden zur Prüfung der Viruzidie von Desinfektionsmitteln gegenüber HBV entwickelt. Dazu gehören Surrogatassays zur Bestimmung

- der Integrität der viralen DNA (Hilfenhaus et al. 1997),
- der Aktivität der viralen DNA-Polymerase (Howard et al. 1983),
- der Reaktivität des HBs-Ag (Frösner et al. 1982) und
- der physikalischen Integrität infektiöser Viruspartikel (Thraenhart et al. 1982).

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die Ergebnisse dieser Verfahren mit denen von Infektiositätstests nicht korrelieren.

Die Entdeckung von Hepadnaviren in Enten (DHBV), Walddarmeltieren (WHBV), und Erdhörnchen (ground squirrel GSHBV) in den späten 1970er Jahren eröffnete die Möglichkeit, anstelle der Schimpansen andere Tiermodelle für wissenschaftliche und routinemäßige Untersuchungen zu nutzen (Blumberg 1981, Gerlich und Schäfer 2002) (Abb. 6).

Es zeigte sich, dass das DHBV am besten als Modellvirus zur Untersuchung der Replikationsschritte des HBV geeignet war (Mason et al. 1983). Da primäre Entenhepatozytenkulturen im Labor relativ leicht mit DHBV infiziert werden können (Tuttleman et al. 1986a, Marion et al. 1987), bot sich dieses System zur Bestimmung

der Infektiosität bei der Testung von Desinfektionsmitteln gegenüber HBV an (Murray et al. 1991, Prince et al. 1993). Entenküken sind innerhalb der ersten Lebensstage hochempfindlich für eine DHBV-Infektion, und infizierte Tiere bleiben lebenslang virämisch. Der natürliche Hauptinfektionsweg des DHBV ist die vertikale Transmission. Testviren können in hoher Konzentration aus dem Serum infizierter Küken gewonnen werden.

In den 1990er Jahren wurden Studienprotokolle mit DHBV für Untersuchungen zur Inaktivierung des HBV entwickelt (Eble und Corash 1996). Anhand von Testergebnissen für Desinfektionsmittel auf Basis von quarternären Ammoniumbasen und Phenol, die in Schimpansenversuchen erhoben worden waren, konnte gezeigt werden, dass HBV und DHBV etwa gleich empfindlich auf die Substanzen reagierten (Prince et al. 1993).

Als vielversprechend und zuverlässig gilt der Einsatz des DHBV als Surrogatvirus zur Prüfung der Viruzidie von Desinfektionsmitteln gegenüber dem HBV. In den USA und Australien wird dieses Virus seit längerem als Surrogatvirus für das HBV zur Prüfung der Viruzidie von Desinfektionsmitteln empfohlen (Gerlich und Glebe 2004, Murray et al. 1991, Chaufour et al. 1999).

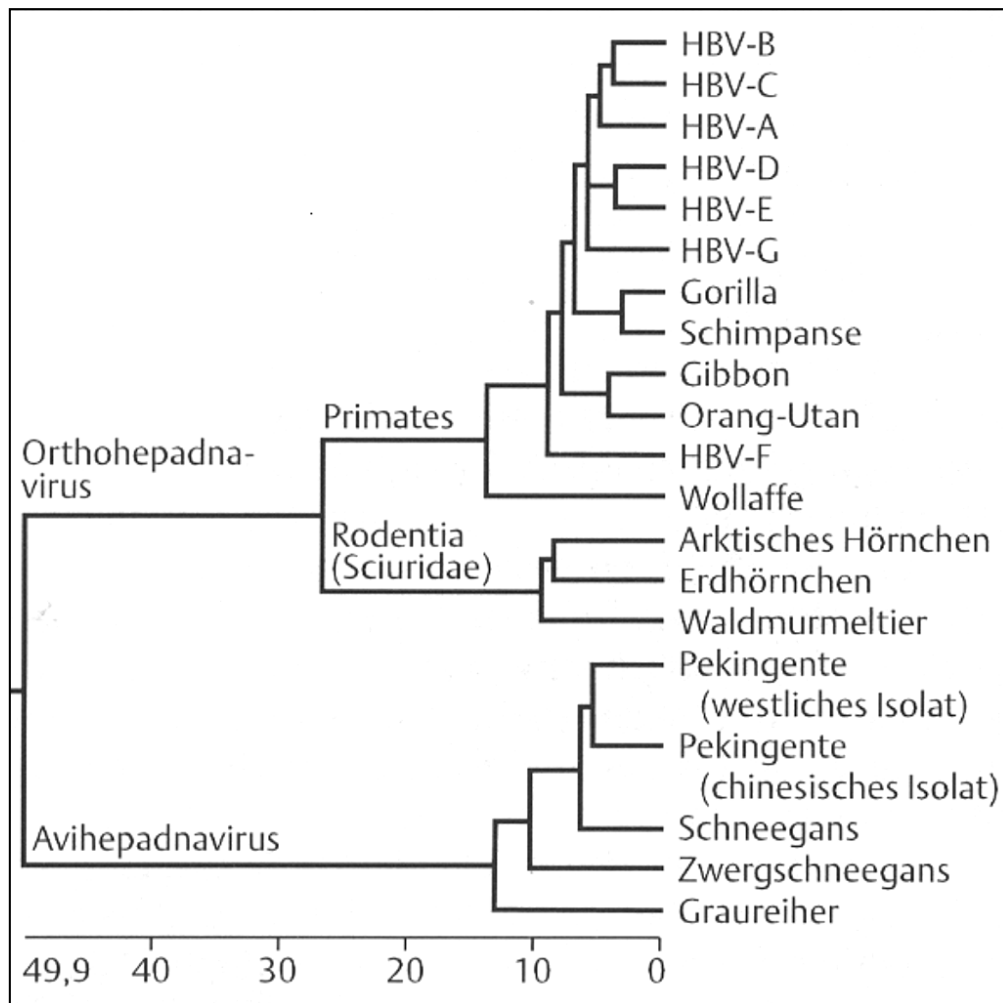


Abb. 6. Phylogenetischer Stammbaum der HBV-Genomtypen A-G (HBV-H nicht aufgeführt) des Menschen und der bekannten Hepadnaviren bei Tieren. Quelle: (Gerlich und Schaefer, 2002).

Am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena wurde in umfangreichen Experimenten ein Test zur Validierung der Viruzidie von Desinfektionsmitteln entwickelt, der auf dem DHBV basiert (Sauerbrei et al. 2005, 2006; Schacke 2009). Mit dieser Methode sollten die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt werden.

2.6. Aufgabenstellung

Das DHBV ist als Surrogatvirus zur Testung von Desinfektionsmitteln gegenüber dem humanen HBV international anerkannt. Die für Deutschland geltende Leitlinie der DVV und des RKI zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin sieht für die Prüfung von Desinfektionsmitteln mit begrenzt viruzider Wirksamkeit das Vacciniavirus Stamm Elstree bzw. das MVA als Modellviren vor (Blümel et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob Unterschiede zwischen dem DHBV und dem Vacciniavirus/MVA in Bezug auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den in Desinfektionsmitteln am häufigsten enthaltenen Wirkstoffen bestehen. Wäre dies der Fall, müsste das DHBV als zusätzliches Testvirus für Wirksamkeitsprüfungen von Desinfektionsmitteln für die Deklaration „begrenzt viruzid“ mit einbezogen werden.

Es war geplant, die Versuche mit DHBV im quantitativen Suspensionstest nach einer am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena etablierten Methode mit Entenleberhepatozyten durchzuführen, wobei die Testviren aus dem Serum kongenital infizierter Peking-Enten stammten. Die Testung des DHBV sollte gegenüber den Substanzgruppen Alkohole (Ethanol und Isopropanol), Aldehyde (Glutardialdehyd und Formaldehyd) und Persäuren (Peressigsäure) durchgeführt werden. Zur Erfassung der Inaktivierungskinetik der Substanzen war die Anwendung in unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten vorgesehen. Der Ausschluss einer kongenitalen DHBV-Infektion der Entenküken, von denen die Hepatozyten kultiviert wurden, sollte mittels einer qualitativen In house-Polymerasekettenreaktion (PCR) zum DHBV-DNA-Nachweis erfolgen. Da Hepadnaviren nach Infektion von Hepatozyten keinen zytopathischen Effekt auslösen, war vorgesehen, zur Bestimmung der DHBV-Titer in den Zellkulturen den indirekten Immunfluoreszenztest einzusetzen.

Die Versuchsreihen sollten entsprechend der DVV/RKI-Leitlinie (Blümel et al. 2008) mit geringfügigen Modifikationen angelegt werden. Die Testergebnisse für Vacciniavirus/MVA konnten der Originalarbeit von Rabenau et al. (2010) entnommen werden, da diese Versuche ebenfalls nach dieser Leitlinie vorgenommen worden waren. Die Versuchsergebnisse sollten zur Entscheidungsfindung über den Einsatz der Modellviren zur Prüfung von Desinfektionsmitteln mit dem Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“ beitragen.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Für die Untersuchungen wurden primäre embryonale Enten-Hepatozyten verwendet, die nach einer von Sauerbrei et al. (2005, 2006) beschriebenen Methode präpariert wurden. Ausgangsmaterial waren befruchtete Eier der Peking-Ente, die von der Geflügelfarm Pötzsch (Ostrau, Deutschland) bezogen wurden. Nach Aufbewahrung für 2-3 Tage bei 7-10°C wurden die Eier in horizontaler Lage in einem Brutschrank mit Luftzirkulation (Brutgerät MP GTFS, Brutgeräte Grumbach, Asslar) bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% bebrütet. Ab dem 3. Tag nach Inkubationsbeginn erfolgte im Abstand von 4 h automatisch eine 180°-Drehung.

Nach 18-21 Tagen wurden den Enten-Embryonen unter aseptischen Bedingungen die Lebern entnommen. Dazu wurden nach Lokalisation der Luftblase unter einer Schierlampe die Eier an der Luftblase eröffnet. Die Eihäute wurden entfernt und der Embryo in eine große Petrischale überführt. Nach zügigem Dekapitieren des Embryos wurde der Dottersack entfernt. Der Torso wurde auf einem Brettchen mit Nadeln fixiert, und die Federn wurden im Bauch- und Brustbereich entfernt. Im Anschluss an die Eröffnung der Bauchhöhle wurden beide Leberlappen entnommen und in ein Becherglas mit Kulturmedium (s. Rezepturen 3.7.) überführt.

Das Lebergewebe von 6-7 Embryonen wurde unter sterilen Bedingungen gepoolt, mit einem Skalpell in 1-2 mm große Stücke zerkleinert und dreimal mit PBS (s. Rezepturen 3.7.) unter Zusatz von 1 mg/l Glukose gewaschen. Anschließend wurde das Lebergewebe in einer Trypsin-EDTA-Lösung (s. Rezepturen 3.7.) im Dunkeln unter Rühren verdaut und die erhaltene Zellsuspension nach 30 min entnommen. Dieser Vorgang wurde nach Zusatz frischer Trypsin-EDTA-Lösung mehrfach wiederholt. Um den Verdauungsprozess zu stoppen, erhielten die Zellsuspensionen einen Zusatz von 5% FKS. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 200 x g für 10 min sedimentiert und in 50 ml Wachstumsmedium (s. Rezepturen 3.7.) aufgenommen. Die Zellsuspension konnte bei 4°C für wenige Stunden aufbewahrt werden.

Um sicherzustellen, dass die entnommenen Lebern frei von DHBV waren, wurde nach dem 1. Waschvorgang jeweils eine Probe mittels einer qualitativen PCR auf

Virus-DNA untersucht, deren Methodik unter 3.4. beschrieben ist. Für die weitere Kultivierung fanden nur die von DHBV-DNA-negativen Embryonen gewonnenen Zellsuspensionen Verwendung.

Die Kultivierung der Leberzellen (Abb. 7) erfolgte in Zellkulturplatten mit 24 Kavitäten (24-Well-Platte; CellBind®, Corning, Acton, USA). Pro Well wurde 1 ml einer Zellsuspension mit circa $0,8 \times 10^6$ Zellen pro ml eingesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂. Das Wachstumsmedium (s. Rezepturen 3.7.) wurde nach 24 h und am Tag 4 erneuert.

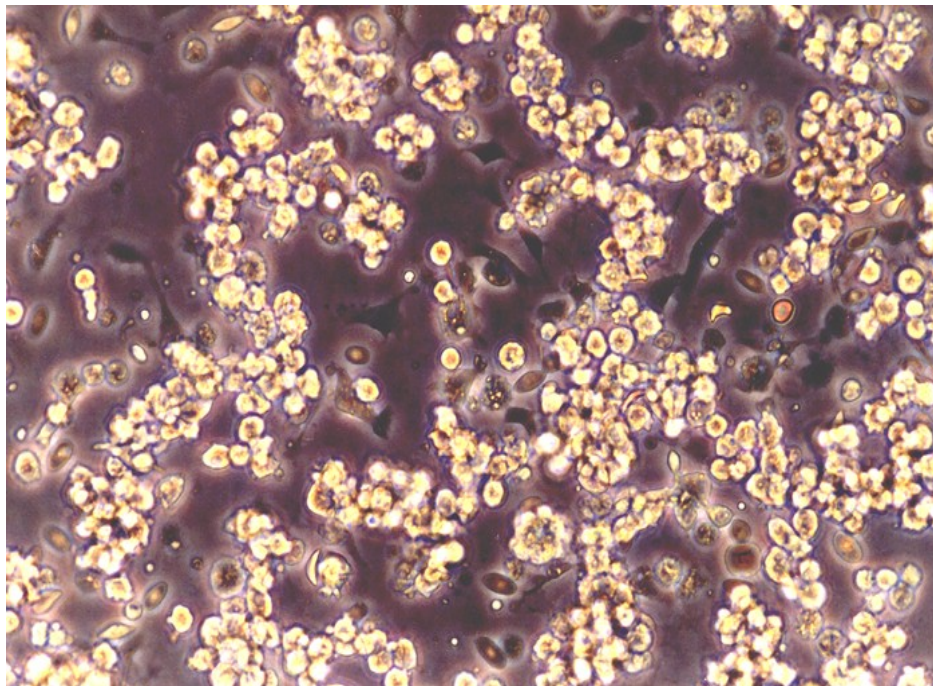


Abb. 7: Primäre embryonale Entenhepatozyten 2 h nach Aussaat
(Phasenkontrast, Originalvergrößerung 150x)

3.2. Virus

Für die Desinfektionsmittelprüfung wurde DHBV im Serum kongenital infizierter Peking-Enten verwendet. Das Serum dieser Tiere wurde freundlicherweise von Prof. Dr. M. Nassal (Abteilung für Innere Medizin II / Molekularbiologie, Universitätsklinikum Freiburg) zur Verfügung gestellt. Der Gehalt an infektiösen DHBV-Partikeln lag zwischen $10^{6.0}$ und $10^{7.13}$ TCID₅₀ pro ml. Dies entsprach einer Anzahl von $10^{8.77}$ bis

$10^{9,90}$ DHBV-Genomkopien pro ml. Die Seren wurden in Portionen zu 0,5 ml abgefüllt und bei -80°C ohne Unterbrechung der Kühlkette gelagert.

3.3. Desinfektionsmittel

Getestet wurden Ethanol, Isopropanol, Peressigsäure, Glutardialdehyd und Formaldehyd in unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten, wie in Tabelle 3 dargestellt. Die Stammlösungen dieser Desinfektionsmittel wurden von einem unabhängigen Lieferanten hergestellt (Dr. F. Rheinbaben, Ecolab, Deutschland GmbH, Düsseldorf) und innerhalb von 24 h angeliefert.

Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung der getesteten Desinfektionsmittel nach Konzentrationen und Einwirkzeiten

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkzeiten (min)
Ethanol	30, 40, 50, 60, v/v	1, 2
Isopropanol	20, 30, 40, v/v	1, 2
Peressigsäure	0,001, 0,005, 0,01, 0,05, v/v	1, 2
Glutardialdehyd	0,05, 0,1, w/w; pH 8.4	0,5, 2, 5
Formaldehyd	0,7, v/w; pH 7.0	5, 30, 60

v/v – Volumenprozent, w/w – Gewichtsprozent, v/w – Volumen-/Gewichtprozent

Die benötigten Testkonzentrationen für Ethanol (99,8%ige Stammlösung) und Isopropanol (99,5%ige Stammlösung) wurden vor Versuchsbeginn durch Verdünnen mit sterilem A. bidest. hergestellt.

Peressigsäure wurde in Form einer 20%igen Stammlösung verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Durch Verdünnung mit A. bidest. wurde eine 2%ige Lösung hergestellt. Die Ermittlung der aktuellen Konzentration erfolgte durch iodometrische Titration (Mücke 1973) vor Versuchsbeginn. Zur iodometrischen Titration der Peressigsäure wurden 1 ml einer etwa 2%igen Peressigsäure-Lösung mit 20 ml Eiswasser verdünnt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml 20%iger Kaliumiodidlösung. Im Anschluss daran wurde mit 0,1 N Natriumthiosulfatlösung bis zur Entfärbung titriert und die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gehalt an Peressigsäure in \%} = \frac{\text{verbrauchte ml 1N Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}{10 \times \text{Einwaage in ml}}$$

Für die Herstellung der verwendeten Gebrauchskonzentrationen von Glutardialdehyd wurde von einer handelsüblichen 50%igen wässrigen Lösung ausgegangen. Um daraus eine 5%ige Lösung herzustellen, wurde unter dem Abzug 1 g Glutardialdehyd entnommen und mit PBS (pH 8,4, s. Rezepturen 3.7.) auf 100 ml aufgefüllt. Die 5%ige Lösung diente als Stammlösung, aus der die für die Untersuchungen benötigten Konzentrationen durch Verdünnung mit PBS hergestellt wurden.

Die eingesetzte 0,7%ige Formaldehyd-Lösung wurde aus einer 37%igen Stammlösung durch Verdünnung mit A. bidest. hergestellt.

3.4. Polymerasekettenreaktion zum qualitativen Nachweis von Duck Hepatitis B Virus-DNA

3.4.1. DNA-Präparation

Zum qualitativen Nachweis von DHBV-DNA in den zu verwendenden Enten-Hepatozyten wurde eine in house-PCR eingesetzt (Sauerbrei et al. 2005). Zunächst wurde die DNA mittels QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden) aus den Hepatozyten isoliert und aufgereinigt. Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Zum Lyseansatz wurden 20 µl Qiagen-Protease, 200 µl virushaltiges Material und 200 µl Lysisbuffer AL aufeinander folgend in ein Safelock-Eppendorf-Röhrchen pipettiert, ca. 15 s mit dem Vortexer gemischt und dicht verschlossen. Nach kurzer Zentrifugation für 12 s erfolgte eine Wärmebehandlung für 10 min bei 56°C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg). Hierbei wurden die Zellwände aufgelöst und die DNA freigesetzt.
- Durch Zusatz von 200 µl 96 bis 100%igem Ethanol und gutes Durchmischen wurde die Lyse gestoppt und die DNA präzipitiert.
- Es folgte die Aufzentrifugation der entstandenen Mischung auf eine QIAamp-Minisäule bei 6.000 x g für 1 min. Durch diesen Arbeitsschritt wurde die DNA von der Lösung getrennt und in eine der Reinigung zugängliche Form überführt. Die DNA blieb in der Minisäule fixiert, und die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen.
- Zwecks Reinigung der DNA wurde die Minisäule nacheinander mit 500 µl des mitgelieferten Waschpuffers I AW 1 und Waschpuffers II AW 2 bestückt und jeweils 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Hierbei wurde das Auffanggefäß gewechselt. Zur Restpufferentfernung erfolgte eine hochtourige Zentrifugation bei 16.000 x g über 1 min.

- Abschließend wurde mit 50 µl Elutionspuffer AE die gereinigte DNA von der Minisäule gelöst. Zu diesem Zweck wurde die mit dem Elutionspuffer versehene Minisäule in ein Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen platziert, für 1 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend für 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Um eine restlose Wiedergewinnung des Eluats zu erreichen, wurde abschließend nochmals 1 min bei einer vollen Drehzahl von 16.000 x g zentrifugiert.

Die auf diese Weise gewonnenen DNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung kurzzeitig im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.4.2. Virus-DNA-Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion

Für den DHBV-DNA-Nachweis wurde eine qualitative One-Step-PCR eingesetzt. Die Nukleotidsequenz der verwendeten Primer, ihre Lokalisation im DHBV-Genom sowie die Größe des Amplifikationsproduktes sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Die Primersynthese erfolgte im Institut für Virologie und Antivirale Therapie. Zur Herstellung der DNA-Primer diente der Expedite™ DNA/RNA Synthesizer, Modell 8909 (Applied Biosystems, Framingham, USA; Software-Version 2.4). Für das nach der Festphasen-Phosphoramidit-Methode arbeitende System wurden Cyanoethyl-Phosphoramidit, CDI-Aktivator (Di-cyanomidazol), Cappingreagens, Oxidationsmittel, Detritylierungsmittel und Acetonitril (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg) verwendet. Als Festphasenträger dienten bei der Herstellung der Primer spezielle Säulen des Typs CPG-500 Å LCAA (Proligo Biochemie GmbH) mit den entsprechenden Startnukleosiden. Zur Abspaltung vom Träger und zur Entschützung wurde die Säule 1,5 h mit 28%igem wässrigem Ammoniak und anschließend 20–24 h bei 55°C behandelt. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte mittels Shimadzu HPLC LC 10AT Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung einer Mono Q MR 5/5 Anionenaustauschsäule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit einem linearen Salzgradienten bis 1 M NaCl und 10 mM NaOH. Zur Entsalzung diente Sephadex G 25 (Pharmacia).

Tab. 4: Primer-Design zur Amplifikation von DHBV-DNA mittels PCR

Nukleotidsequenz 5'----->3'	Nukleotide des DHBV- Genoms	Amplifi- kations- produkt (base pairs)	Literatur
Primer DHBV-1: gCgCTTTCCAAgATACTggAgCCCAA	1426-1451	1.020	Protzer et al. 1999
Primer DHBV-2: CTggATgggCCgTCAGCAggATTATA	2445-2420		

Das PCR-Protokoll zur Amplifikation von DHBV-DNA wurde unter Verwendung von Komponenten des HotStarTaq Master Mix Kits (Qiagen) in Anlehnung an die Originalliteratur gestaltet. Hierbei waren grundsätzlich im Mastermix folgende Komponenten enthalten:

- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 1 µl dNTP-Mix (200 µM Endkonzentration jedes dNTPs)
- 1 µl Q-Solution
- 1.25 U HotStarTaq DNA-Polymerase
- 0,5 µl jedes Primers (finale Konzentration: jeweils 1 µM)
- Steriles A. bidest. (ad 50 µl)

Als Template waren 5 µl mit ca. 100 ng DNA vorgesehen. Mittels Vortexer wurde das Amplifikationsgemisch nach Zugabe von 5 µl DNA für 10 s gemischt. Die Realisierung der Temperaturprofile zu den einzelnen Amplifikationsschritten, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisierung, erfolgte in einem T4-Thermozykler (Biometra, Göttingen). Dem eigentlichen Startzyklus musste eine

Temperaturphase von 95°C für 15 min vorgeschaltet sein, um die HotStarTaq-Polymerase zu aktivieren. Am Ende des Zyklus wurden die Proben im Thermozykler auf 4°C abgekühlt. Abfolge und Dauer der einzelnen PCR-Schritte sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Zeitlicher Verlauf der PCR

Zyklusanzahl	Vorgang	Temperatur	Dauer
30	Denaturierung	94°C	1 min
	Hybridisierung	72°C	1 min
	Polymerisierung	72°C	1 min

3.4.3. Darstellung der viralen DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Das verwendete Verfahren der Agarosegelelektrophorese zur Darstellung der Amplifikate entsprach dem Standardprotokoll nach Maniatis et al. (1982). Es wurde unter Verwendung einer Minielektrophoresekammer (Serva, Heidelberg) durchgeführt.

Zunächst wurde der benötigte Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure (TBE)-Puffer als Stocklösung in einer Konzentration von 5x TBE (s. Rezepturen 3.7.) zubereitet. Die Verdünnung auf 1 x TBE erfolgte kurz vor seiner Verwendung. Entsprechend der zu erwartenden Größe der Amplifikate und Restriktionsfragmente (Angaben in base pairs,) wurde eine 2%ige Agarose für DNA-Zwecke (Serva), aufgenommen in 1 x TBE, verwendet. Diese wurde, in 35 ml-Portionen abgefüllt, als Vorrat im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Zubereitung des Elektrophoresegels erfolgte durch Verflüssigung der Agarose in einem Mikrowellengerät. Nach Abkühlung auf ca.

50°C wurden zum späteren Sichtbarmachen der DNA unter UV-Licht 2 µl Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugegeben und das Gelbett mit Hilfe des zur Elektrophoresekammer gehörenden Gel-Gieß-Kits blasenfrei zubereitet. Die Schichtdicke des Gels betrug 5 mm, die Gelfläche 65 x 10 mm. Zum Formieren der Probenreservoirs wurde ein Teflonkamm mit einer Zahngröße von 2 x 4 mm in das noch flüssige Gel eingehängt. Dieser sorgte für acht bzw. zwölf Vertiefungen mit einem Fassungsvermögen von bis zu 20 µl im Agarosegel. Vor dem Beladen des Gels mit den DNA-Proben wurde das erstarrte Gel im Gelträger aus der Gießvorrichtung herausgenommen und in die Elektrophoresekammer umgesetzt. Es folgte die Zugabe von 1 x TBE-Puffer bis ca. 3 mm über die Geloberfläche.

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 6 x Ladepuffer (s. Rezepturen 3.7.) im Verhältnis von 1:6 versetzt und vorsichtig in die Gelvertiefungen pipettiert. Zur Größenbestimmung der darzustellenden DNA-Fragmente diente der Molekulargewichtsstandard Hyperladder 1 (Bioline GmbH, Luckenwalde) in einer Konzentration von 250 µg/ml, der bei jeder Elektrophorese mitgeführt wurde.

Jeweils 5 µl des Molekulargewichtsstandards wurden mit 1 µl 6 x Ladepuffer gemischt und ebenfalls in die Gelvertiefungen pipettiert. Nach Schließen des Deckels der Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 80 V Gleichstrom über 1 h angelegt, wobei die Wanderung der DNA-Fragmente entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte. Anschließend wurden die DNA-Banden im Gel durch UV-Licht mit einer Intensität von 9,4 mW pro cm² unter Verwendung eines Transilluminators (HSI Hoefer Scientific Instruments, Atlanta, USA) sichtbar gemacht. In Auswertung der Befunde erfolgte die Größenbestimmung der DNA-Amplifikate im Vergleich zu den DNA-Fragmenten des mitgelaufenen Molekulargewichtsstandards (Gawellek 2004).

Die Sensitivität der eingesetzten PCR wurde unter Verwendung des DHBV-Plasmids pCD16 (Protzer et al. 1999) mit 3×10^3 DHBV-Genomkopien pro µl (Abb. 8) bestimmt (Sauerbrei et al. 2005).

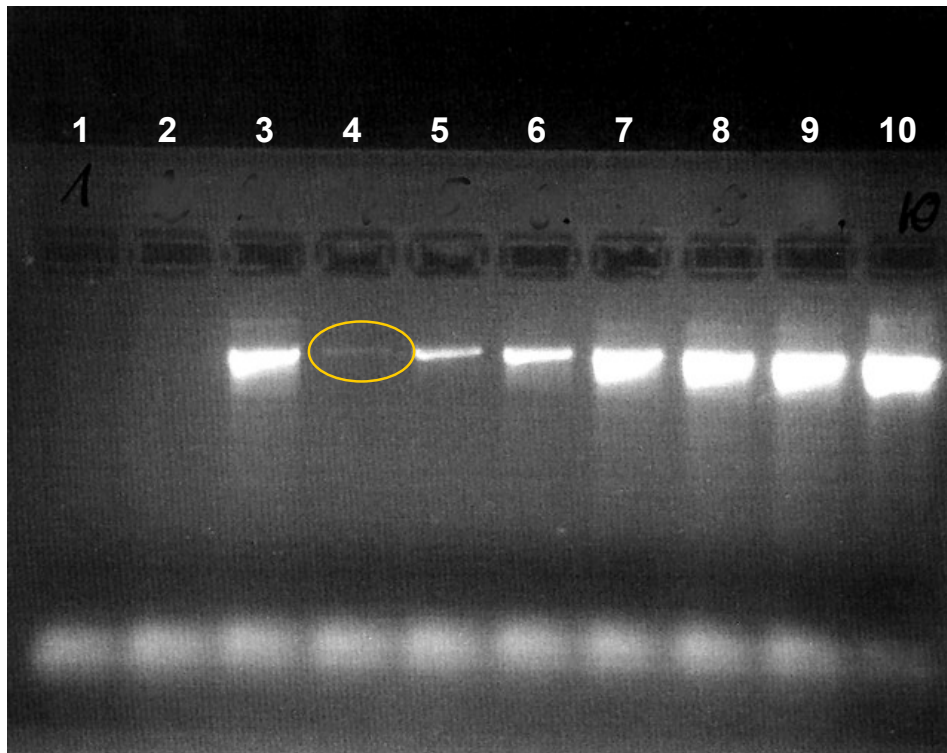


Abb. 8: Ergebnisse der DHBV-PCR unter Verwendung von primären embryonalen Enten-Hepatozyten sowie des Plasmids pCD16 als Targets. Banden 1 und 2: DHBV-negative primäre embryonale Enten-Hepatozyten; Bande 3: DHBV-positive embryonale Enten-Hepatozyten; Banden 4-10: pCD16, 3×10^3 Kop./ μ l (4), 3×10^4 Kop./ μ l (5), 3×10^5 Kop./ μ l (6), 3×10^6 Kop./ μ l (7), 3×10^7 Kop./ μ l (8), 3×10^8 Kop./ μ l (9), 3×10^9 Kop./ μ l (10)

3.5. Quantitativer Suspensionsversuch

3.5.1. Versuchsdurchführung

Die Bestimmung der viruziden Eigenschaften der zu prüfenden Desinfektionsmittel erfolgte im quantitativen Suspensionsversuch nach der Richtlinie der DVV und des RKI, wobei geringfügige Modifikationen vorgenommen wurden (Anonym 2005; Blümel et al. 2008). Zunächst wurde ein Teil DHBV-haltiges Entenserum mit einem Teil FKS gemischt. Diesem Gemisch wurden 8 Volumenteile des jeweiligen Desinfektionsmittels hinzugefügt, dessen Konzentration um den Faktor 1,25 höher war als die zu prüfende Konzentration. Damit wurde im Versuchsansatz der Verdünnungseffekt durch das Gemisch von FKS ausgeglichen. Alle Reaktionspartner wurden vor Versuchsbeginn auf 20-22°C temperiert und während der Testung in diesem Temperaturbereich gehalten.

Nach Ablauf der gewählten Einwirkungszeit erfolgte die Entfernung des Desinfektionsmittels durch Molekularsiebfiltration. Bei diesem Vorgang binden die Desinfektionsmittel an ein Matrix-Gel, während die Viruspartikel beim Zentrifugieren eluiert werden. Zu diesem Zweck wurden unmittelbar nach Ablauf der Reaktionszeit 125 µl des Reaktionsgemisches auf eine MicroSpinTM S-400 HR Säule (GE Healthcare UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) aufgebracht und bei 737 x g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden 120 µl des Elutats in eiskaltem Zellkulturmedium (s. Rezepturen 3.7.) aufgenommen, so dass eine Virusverdünnung von $10^{-1.7}$ entstand. Die Bestimmung der Infektiosität der Proben erfolgte nach der Endverdünnungsmethode in 24-Well-Mikrotiterplatten. Dazu wurde von der resultierenden Virussuspension umgehend eine Verdünnungsreihe (Faktor 10) bis $10^{-7.7}$ in eiskaltem Zellkulturmedium angelegt. Von jeder Verdünnung wurden 500 µl in die Kavitäten der Mikrotestplatte gefüllt, die Monolayer primärer embryonaler Hepatozyten am 4. Tag nach der Einsaat (Abb. 9) sowie 50 µl Zellkulturmedium enthielten.

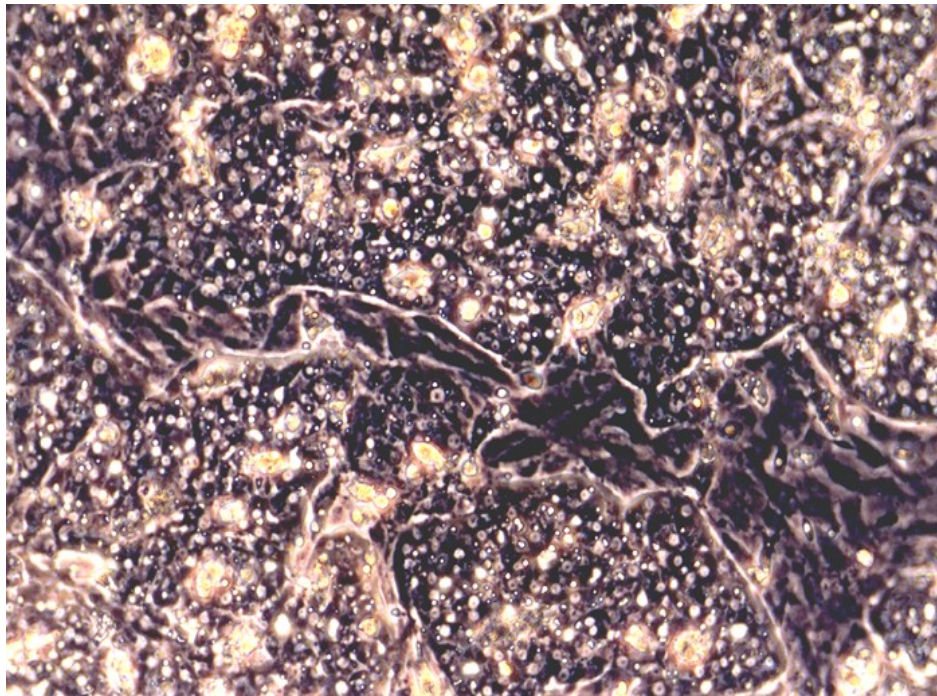


Abb. 9: Primäre embryonale Entenhepatozyten 3 Tage nach Aussaat
(Phasenkontrast, Originalvergrößerung 100x)

Die Endverdünnung der Testviren betrug somit 10^{-2} bis 10^{-8} . Die so beschickten Mikrotestplatten wurden bei 37°C für 7-10 Tage bebrütet. Der Nachweis der infizierten Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenz, wie unter 3.6. beschrieben.

3.5.2. Viruskontrolle

Zur Bestimmung des aktuellen Virustiters wurden parallel zu jedem Versuchsansatz Testreihen angesetzt, bei denen das Desinfektionsmittel durch A. bidest. ersetzt wurde.

3.5.3. Bestimmung der Zytotoxizität

Um virusbedingte Zellveränderungen von toxischen Zellschädigungen abgrenzen zu können, wurden die zelltoxischen Eigenschaften der Desinfektionsmittel bestimmt. Dazu wurden aus einem Gemisch von einem Teil Wasser standardisierter Härte, einem Teil FKS als organische Belastung und 8 Teilen des Desinfektionsmittels

Verdünnungsreihen (Faktor 10) angesetzt (s. Rezepturen 3.7.). Die Konzentration des Desinfektionsmittels war 1,25fach höher als die zu prüfende. Von jeder Verdünnung wurden Aliquots von 100 µl in 24-Well Mikrotiterplatten eingebracht, die Monolayer von primären embryonalen Hepatozyten 4-5 Tage nach der Einsaat enthielten. Nach 7-10tägiger Bebrütung bei 37°C wurden die Monolayer für die fluoreszenzoptische Auswertung, wie unter 3.5. beschrieben, behandelt. Zytotoxizität war nachweisbar, wenn sich die Zellmonolayer von der Unterfläche lösten und sich die Hepatozyten abrundeten und ihre polygonale Form verloren. Die Hepatozytotoxizität wurde für alle Versuchsreihen anhand der logarithmischen zytotoxischen Dosis bei 50% Zytotoxizität ($\log_{10} \text{CD}_{50}/\text{ml}$) in Analogie zur TCID_{50} nach Spearman (1908) und Kaerber (1931) berechnet.

3.6. Immunfluoreszenztest zum Nachweis der Duck Hepatitis B Virus-Antigene

Da Hepadnaviren nach Infektion von Hepatozyten keinen zytopathischen Effekt auslösen, ist die Infektion in Zellkulturen nur mit indirekten Methoden wie z.B. dem Immunfluoreszenztest nachweisbar. Das Prinzip (Abb. 10) besteht darin, dass zunächst die infizierten Zellen, die entsprechende virale Antigene exprimieren, mit einem Primärantikörper inkubiert werden, der für die nachzuweisenden Antigene spezifisch ist. Nach einem Waschvorgang wird ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist. Dieser Sekundärantikörper bindet sich an die schwere Kette des Primärantikörpers. Die überschüssigen Sekundärantikörper werden durch einen weiteren Waschvorgang entfernt. Abschließend wird die Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop bewertet, wobei die vom Virus befallenen Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff eine farbliche Fluoreszenz zeigen.

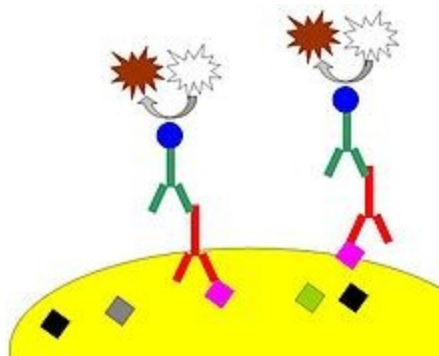


Abb. 10: Prinzip des indirekten Fluoreszenzantikörpertests

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1b/Immunohistochemistry.jpg/220px-Immunohistochemistry.jpg>)

Die DHBV-infizierten Zellen exprimieren das Oberflächenantigen DHBs-Ag, das mit einem spezifischen Antikörper reagiert und so über die Bindung an ein mit Fluorochrom markiertes Antispezies-Serum optisch dargestellt werden kann. Ein für diese Zwecke einsetzbares polyvalentes Anti-DHBs-Ag-positives Serum vom Kaninchen wurde freundlicherweise von PD Dr. Dieter Glebe, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen, zur Verfügung gestellt. Zum Nachweis der Virusantigen-tragenden Hepatozyten wurden die behandelten Hepatozytenmonolayer in den Plattenvertiefungen einmal in PBS (s. Rezepturen 3.7.) gewaschen und mit einem Gemisch von Aceton und Methanol (1:1) für 10 min bei -20°C fixiert. Nach Lufttrocknung wurden die Zellpräparationen in PBS für 5 min bei Raumtemperatur rehydriert und mit dem polyvalenten Anti-DHBs-Ag-Serum vom Kaninchen in einer Gebrauchsverdünnung von 1:100 für 1 h bei 37°C behandelt. Nach drei Waschvorgängen in PBS erfolgte die Zugabe von Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege, gekoppelt mit Alexa Fluor® 488 (Life Technologies, Darmstadt), in einer Verdünnung von 1:400 in PBS mit Zusatz von 0,001% Evansblau und Tween 80. Die Auswertung der Wells erfolgte mit dem Inversions-Phasenkontrast-Fluoreszenzmikroskop DIAPHOT-TMD Firma Nikon (Nikon-Corporation, Tokyo, Japan). Visuell wurde die Gesamtzahl der positiven Zellen, d.h. der Zellen mit einer grünen spezifischen Fluoreszenz (Abb. 12), pro Well ausgezählt. Als letzte positive Verdünnungsstufe galt die, in der noch Zellen mit einer spezifischen Fluoreszenz nachweisbar waren. Die Abbildung 11 zeigt die Negativkontrolle bei fehlendem Nachweis von DHBs-Ag in nicht infizierten Enten-Hepatozyten.

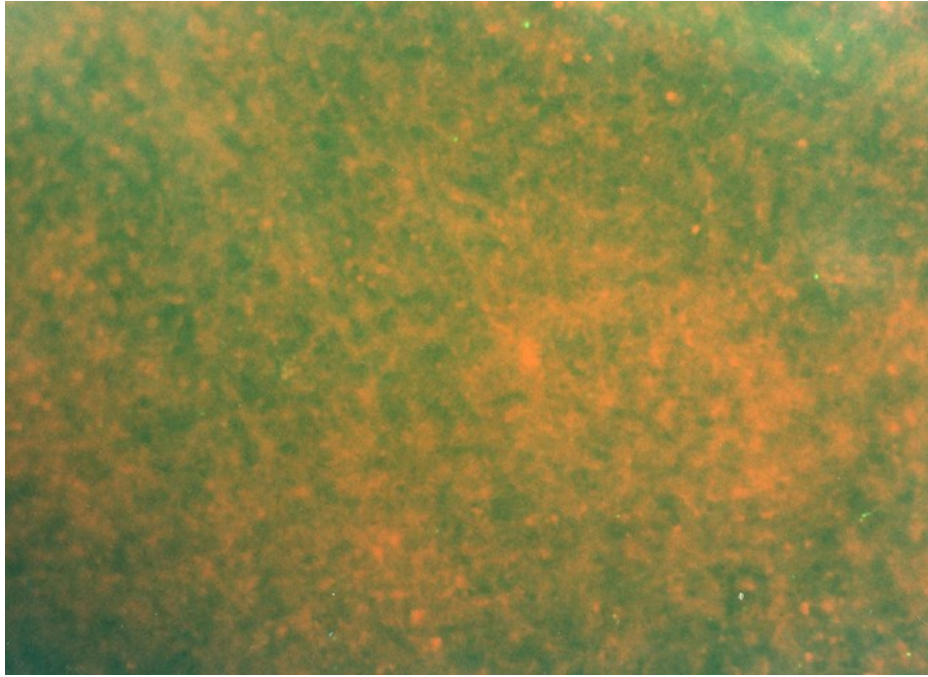


Abb. 11: Fehlender Nachweis des DHBs-Ag in nicht infizierten primären embryonalen Enten-Hepatozyten als Negativkontrolle (Originalvergrößerung 125x), Quelle: Sauerbrei et al. 2006

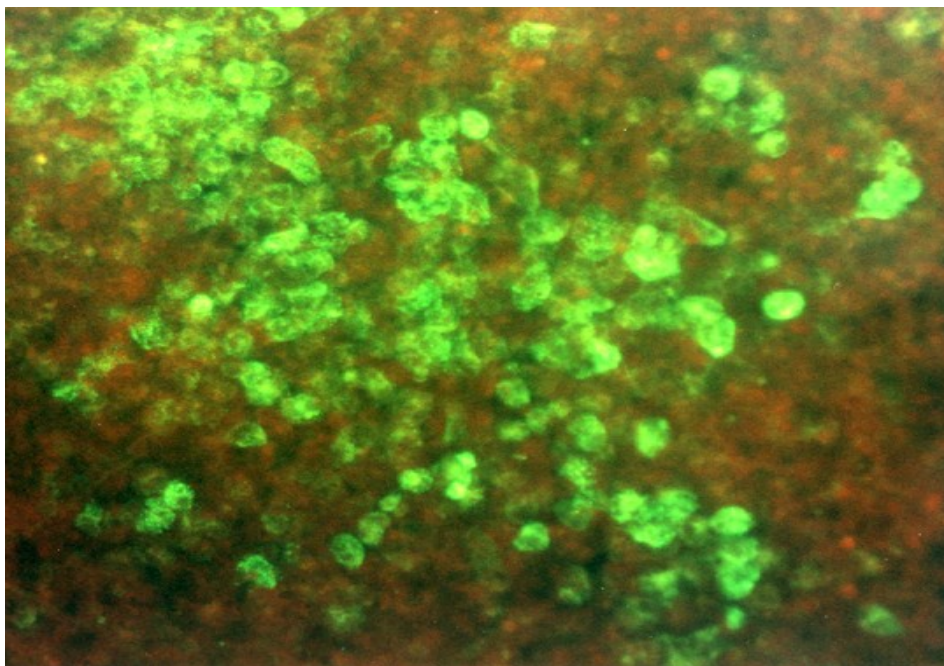


Abb. 12: Nachweis von DHBs-Ag in primären embryonalen Entenhepatozyten 6 Tage nach Infektion mit 10^2 TCID₅₀ DHBV vom Serum kongenital infizierter Peking-Enten (Originalvergrößerung 125x). Quelle: Sauerbrei et al. 2006

3.7. Rezepturen der verwendeten Lösungen und Nährmedien

Phosphate-buffered Saline (PBS) pH 7,4:

NaCl	40,0 g
KCl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	5,7 g
A. bidest.	ad 5,0 l

5 x Tris-Borat-EDTA (TBE) pH 8,3:

Tris Base	108,0 g
Borsäure	55,0 g
EDTA 0,5M pH 8,0	40 ml
A. bidest.	ad 2,0 l

Für PCR-Elektrophorese 5 x TBE 1:5 mit A. bidest verdünnen.

EDTA 0,5 M pH 8,0

EDTA (Chelaplex III)	18,6 g
A. bidest. ad	100 ml

Mit NaOH-Plätzchen auf pH 8,0 einstellen (ca. 2 g)

PCR-Ladepuffer für Gelelektrophorese

Bromphenolblau	50 mg
EDTA-Lösung pH 8,0 10 mM	28 ml
Glycerin 87%	13,76 ml
MG-Standard	
Hyperladder 1 Fa. Bioline	

Trypsin-EDTA-Lösung:

- 1 Volumenteil PBS mit Zusatz von 0,05 % Trypsin und 0,02 % Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) - Lösung
- 4 Volumenteile PBS mit 1 mg/ml Glukose

Hepatozyten-Wachstumsmedium:

Grundlage bildete das Williams Medium E (Invitrogen), das speziell als serumreduziertes Medium für die Langzeitkultivierung von Epithelzellen der Leber von Ratten entwickelt worden war. Es ist für die Kultivierung von Hepatozyten unterschiedlicher Spezies geeignet.

Das Williams Medium E erhielt folgende Zusätze:

- 1,5 % Dimethylsulfoxid (Me_2SO), [Sigma-Aldrich, Taufkirchen]
- 1 % Insulin-Transferrin-Selenium-A Supplement (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt)
- 15 μM Hydrocortison 21-Hemisuccinat Natrium-Salz ($\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NaO}_8$) (Sigma-Aldrich)
- 1 mg/ml Rinderserumalbumin (Sigma-Aldrich)
- 2 mM L-Glutamin (Lonza, Verwiers, Belgien)
- 100 U/ml Streptomycin (Lonza)
- Wasser standardisierter Härte (s. DVV/RKI-Leitlinie, Blümel et al. 2008)

3.8. Statistische Analyse

Jedes Experiment wurde mindestens fünf, maximal zwölf Mal durchgeführt (s. Ergebnisse). Aus der Gesamtzahl der positiven Zellen pro Well – unter Berücksichtigung der Tatsache, dass maximal 40% der Zellen pro Well infiziert waren – wurden die Virustiter für jeden Test, einschließlich der Positivkontrolle, ohne die Behandlung mit einem Desinfektionsmittel errechnet. Zur Berechnung wurde die Methode der Leitlinie der DVV und des RKI zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin, Fassung vom 01. August 2008 (Blümel et al. 2008) zugrunde gelegt. Die Beurteilung der Wirksamkeit eines Mittels erfolgte durch die Berechnung des RF. Dieser Wert ist die Differenz aus dem ohne Einwirkung des Desinfektionsmittels erhaltenen Infektiositätstiter (log₁₀ TCID₅₀/ml der Viruskontrollen) und dem Titer, der nach der Einwirkung des entsprechenden Mittels bestimmt wurde. Die Titer wurden mit dem 95% Konfidenzintervall ermittelt, und daraus wurde der RF mit dem 95% Konfidenzintervall gebildet (Blümel et al. 2008). Von einer für Desinfektionsmittel ausreichenden Viruzidie (viruzider Effekt) wurde gesprochen, wenn die Titerreduktion bei mindestens 4,00 log₁₀ lag, was einer Inaktivierung von ≥99,99% entspricht. War aufgrund der Zytotoxizität die Bestimmung der RF nicht eindeutig möglich, wurde der RF mit „≥“ angegeben. Das 95% Konfidenzintervall der errechneten Titer sollte entsprechend der DVV/RKI-Leitlinie stets <0,5 log₁₀ betragen.

3.9. Testung der Desinfektionsmittel gegenüber Vacciniavirus und Modified Vaccinia Virus Ankara

Die Daten zur Testung der viruziden Aktivität von Ethanol, Isopropanol, Formaldehyd, Glutardialdehyd und Peressigsäure gegenüber Vacciniavirus und MVA wurden dem Manuskript von Rabenau et al. (2010) bzw. den zur Verfügung gestellten Testprotokollen entnommen. Ziel dieser Untersuchungen war es gewesen, zu prüfen, ob Vacciniavirus gegen das für den Menschen ungefährlichere MVA austauschbar ist. Die Untersuchungen waren in 3 unabhängigen deutschen Laboren entsprechend der Leitlinie der DVV und des RKI (Blümel 2008) durchgeführt worden. Die Desinfektionsmittel wurden in unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten unter Belastung mit 10% FKS im Suspensionsversuch geprüft. Die Virustiter wurden nach der Methode von Spearman (1908) und Kaerber (1931) bestimmt und als TCID₅₀/ml inklusive der Standardabweichung angegeben. Die RF errechneten sich aus der Differenz zwischen der Viruskontrolle und dem Virustiter nach Desinfektionsmitteleinwirkung. Eine Titerreduktion von $\geq 4,00 \log_{10}$ wurde als ausreichende Virusinaktivierung entsprechend der Leitlinie angesehen und entsprach einer Inaktivierung von $\geq 99,99\%$. Aus den Einzelwerten wurde der mittlere Reduktionsfaktor (mRF) bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Hepatozytotoxizität der getesteten Desinfektionsmittel

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsbestimmung für die eingesetzten Desinfektionsmittel sind den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen. Zur Überprüfung der Zytotoxizität wurden Ethanol in den Konzentrationen von 30 bis 70% und Isopropanol mit einer Konzentration von 20 bis 40% verwendet. Die Einwirkzeit lag jeweils bei 1 und 2 min. Peressigsäure wurde in einer Konzentration von 0,001 bis 0,05% und Einwirkzeiten von jeweils 1 und 2 min eingesetzt. Formaldehyd wurde in einer Konzentration von 0,7% und einer Einwirkzeit von 5, 30 und 60 min getestet. Glutardialdehyd stand in der Konzentration von 0,05 und 0,1% zur Verfügung und wurde über einen Zeitraum von 0,5, 2 und 5 min angewandt. Die Zytotoxizität, gemessen anhand der \log_{10} CD_{50}/ml , wurde für alle Versuchsreihen bestimmt. Für Ethanol und Isopropanol lag die Zytotoxizität in allen geprüften Konzentrationen und unabhängig der Einwirkzeit von 1 bzw. 2 min bei $\leq 2,00 \log_{10}$. Peressigsäure erreichte den gleichen Wert in den Konzentrationen von 0,001 und 0,005% bei einer Einwirkzeit von 1 und 2 min. Nach Steigerung der Konzentration auf 0,01% bzw. 0,05% wurde eine Zytotoxizität von $\leq 3,00 \log_{10}$ bestimmt. Glutardialdehyd besaß die gleiche Hepatozytotoxizität in den Konzentrationen von 0,05 und 0,1% schon nach Einwirkzeit von 0,5 min, was sich auch bei Einwirkungszeiten von 2 bzw. 5 min nicht änderte. Die höchste Zytotoxizität wurde mit $\leq 4,00 \log_{10}$ für Formaldehyd bestimmt.

Tab. 6: Zytotoxizität (cytotoxic dose 50% - CD₅₀) von Ethanol, Isopropanol und Peressigsäure für primäre embryonale Entenhepatozyten

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkzeit (min)	log ₁₀ CD ₅₀ /ml
Ethanol	30	1	≤2,00
		2	≤2,00
	40	1	≤2,00
		2	≤2,00
	50	1	≤2,00
		2	≤2,00
	60	1	≤2,00
		2	≤2,00
Isopropanol	20	1	≤2,00
		2	≤2,00
	30	1	≤2,00
		2	≤2,00
	40	1	≤2,00
		2	≤2,00
Peressigsäure	0,001	1	≤2,00
		2	≤2,00
	0,005	1	≤2,00
		2	≤2,00
	0,01	1	≤3,00
		2	≤3,00
	0,05	1	≤3,00
		2	≤3,00

Tab. 7: Zytotoxizität (cytotoxic dose 50% - CD₅₀) von Formaldehyd und Glutardialdehyd für primäre embryonale Entenhepatozyten

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkzeit (min)	log ₁₀ CD ₅₀ /ml
Formaldehyd	0,7	5	≤4,00
		30	≤4,00
		60	≤4,00
Glutardialdehyd	0,05	0,5	≤3,00
		2	≤3,00
		5	≤3,00
	0,1	0,5	≤3,00
		2	≤3,00
		5	≤3,00

4.2. Einzelergebnisse zur begrenzten Viruzidie der getesteten Desinfektionsmittel gegenüber dem Duck Hepatitis B Virus

In den nachfolgenden Tabellen wurden die nach Einwirkung des Desinfektionsmittels bestimmten Viruskonzentrationen in \log_{10} der TCID₅₀/ml für die verschiedenen Einwirkzeiten angegeben und darunter in Fettschrift die entsprechenden RF vermerkt, die sich aus der Titerdifferenz der Versuche mit und ohne Desinfektionsmittel ergaben. Das Präfix „≥“ zeigt, dass in dem jeweiligen Versuch die Bestimmung der RF infolge von zytotoxischen Reaktionen des Desinfektionsmittels und/oder wegen des geringen Virustiters der Testsuspension (ermittelt in der Viruskontrolle) nicht möglich war.

Aufgrund des hohen Versuchsaufkommens konnten die Desinfektionsmittel nicht zu jedem Termin in allen Konzentrationen getestet werden. So wurde nach Abschluss von 8 Versuchen insbesondere auf die Testung derjenigen Konzentrationen verzichtet, bei denen bereits RF von $\geq 4,00 \log_{10}$ erzielt worden waren.

- Ethanol

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Testung von Ethanol in den jeweiligen Konzentrationen und Einwirkzeiten gegenüber DHBV dargestellt. Insgesamt wurden bis zu 11 Versuchsreihen im Zeitraum vom 31.03.2010 bis 20.06.2010 durchgeführt. Die Viruskontrollen lagen in den Versuchsreihen zwischen 6,00 und 7,13 \log_{10} TCID₅₀/ml, die RF zwischen 1,23 und 5,13 \log_{10} TCID₅₀/ml.

Für Ethanol in der Konzentration von 30% und einer Einwirkzeit von 1 min ergaben sich RF von 1,23 bis 4,00 \log_{10} . Wurde die Einwirkzeit auf 2 min verlängert, wurden RF von 2,23 bis 4,05 \log_{10} ermittelt. Bei einer Konzentration von 40% und 1 min Einwirkzeit zeigten sich RF zwischen 2,2 und 5,13 \log_{10} . Die Steigerung der Einwirkzeit auf 2 min erbrachte bei der 40%igen Konzentration ein ähnliches Ergebnis mit RF von 2,35 bis 5,13 \log_{10} . Dazu ist zu bemerken, dass nur 2 der 11 Versuchsreihen einen RF von weniger als 4,00 Logarithmusstufen ergaben. In der Konzentration von 50% und einer Einwirkzeit von 1 min lag nur ein Versuchswert mit 3,93 \log_{10} knapp unter der Reduktion von 4,00 Logarithmusstufen. Ansonsten wurden

in den Konzentrationen von 50% mit einer Einwirkungszeit von 2 min sowie 60 und 70% Ethanol bei Einwirkungszeiten von 1 oder 2 min stets RF von $\geq 4,00$ (4,23 bis 5,13) \log_{10} bestimmt.

Tab. 8: Ergebnisse der Testung von Ethanol in Konzentrationen von 30 bis 70% und Einwirkzeiten von 1 bis 2 min gegenüber DHBV

Konzentration (%)	Zeit (min)	Viruskonzentration in log ₁₀ der TCID ₅₀ /ml nach Substanzeinwirkung (Normalschrift) sowie Reduktionsfaktor (Fettschrift)										
		1.Versuch 31.03.10	2.Versuch 12.04.10	3.Versuch 29.04.10	4.Versuch 03.05.10	5.Versuch 03.05.10	6.Versuch 03.05.10	7.Versuch 10.05.10	8.Versuch 10.05.10	9.Versuch 26.05.11	10.Versuch 26.05.10	11.Versuch 20.06.10
30	1	5,00 1,23	4,60 1,70	4,13 2,95	3,60 3,53	3,70 3,43	3,53 3,60	3,81 3,19	3,90 3,10	2,00 4,00	3,00 3,00	2,70 3,30
	2	4,00 2,23	3,95 2,35	3,70 3,38	3,08 4,05	3,23 3,90	3,08 4,05	3,60 3,40	3,30 3,70	2,00 4,00	3,00 3,00	2,00 4,00
40	1	2,70 3,53	4,10 2,20	2,00 5,08	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,00	≤2,00 ≥5,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00
	2	2,48 3,75	3,95 2,35	≤2,00 ≥5,08	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,00	≤2,00 ≥5,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00
50	1	2,30 3,93	≤2,00 ≥4,30	≤2,00 ≥5,08	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,00	≤2,00 ≥5,00	n.d.	n.d.	n.d.
	2	≤2,00 ≥4,23	≤2,00 ≥4,30	≤2,00 ≥5,08	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,00	≤2,00 ≥5,00	n.d.	n.d.	n.d.
60	1	≤2,00 ≥4,23	≤2,00 ≥4,30	≤2,00 ≥5,08	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,00	≤2,00 ≥5,00	n.d.	n.d.	n.d.
	2	≤2,00 ≥4,23	≤2,00 ≥4,30	≤2,00 ≥5,08	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,00	≤2,00 ≥5,00	n.d.	n.d.	n.d.
70	1	≤2,00 ≥4,23	≤2,00 ≥4,30	≤2,00 ≥5,08	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤3,00 ≥4,00	≤3,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	n.d.	n.d.
	2	≤2,00 ≥4,23	≤2,00 ≥4,30	≤2,00 ≥5,08	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤3,00 ≥4,00	≤3,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	n.d.	n.d.
Viruskontrolle (log ₁₀ TCID ₅₀)		6,23	6,30	7,08	7,13	7,13	7,13	7,00	7,00	6,00	6,00	6,00

- Isopropanol

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse zu Isopropanol in 12 Versuchsreihen aufgezeichnet. Diese Versuche wurden vom 31.03.2010 bis zum 20.06.2011 durchgeführt. Die Viruskontrollen lagen zwischen 5,70 und 7,13 \log_{10} TCID₅₀/ml. In der Konzentration von 20% wurde bei Einwirkzeiten von 1 und 2 min in keinem Versuch ein RF von 4,00 \log_{10} erreicht. Die Werte lagen mit 0,42 bis 2,69 \log_{10} deutlich unter den geforderten 4,00 Logarithmusstufen. In der Konzentration von 30% Isopropanol und einer Einwirkzeit von 1 min lagen die RF zwischen 2,19 und 4,53 \log_{10} . Hier wurde ein Wert über 4,00 \log_{10} in 4 der 12 Versuchsreihen erreicht. Nach der Einwirkzeit von 2 min wurden in 8 von 10 Versuchen RF $\geq 4,00 \log_{10}$ ermittelt. Die Ergebnisse für die Reduktion der Viruskonzentration lagen zwischen 3,48 und 5,00 \log_{10} . Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Konzentration von 40% mit RF von 3,48 bis 5,13 \log_{10} .

Tab. 9: Ergebnisse der Testung von Isopropanol in Konzentrationen von 20 bis 40% und Einwirkzeiten von 1 bis 2 min gegenüber DHBV

Konzentration (%)	Zeit (min)	Viruskonzentration in log ₁₀ der TCID ₅₀ /ml nach Substanzeinwirkung (Normalschrift) sowie Reduktionsfaktor (Fettschrift)											
		1.Versuch 31.03.10	2.Versuch 12.04.10	3.Versuch 29.04.10	4.Versuch 29.04.10	5.Versuch 03.05.10	6.Versuch 03.05.10	7.Versuch 10.05.10	8.Versuch 10.05.10	9.Versuch 26.05.11	10.Versuch 26.05.11	11.Versuch 20.06.11	12.Versuch 20.06.11
20	1	3,70 2,53	5,88 0,42	5,57 1,51	5,20 1,88	4,85 2,28	4,74 2,39	4,65 2,35	4,65 2,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	3,54 2,69	5,54 0,76	4,30 2,78	4,51 2,57	4,78 2,35	4,71 2,42	4,46 2,54	4,51 2,49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	1	3,00 3,23	3,74 3,39	3,30 3,83	2,95 4,13	2,60 4,53	2,83 4,30	2,48 4,52	3,81 2,19	3,25 2,75	3,25 2,75	3,00 2,70	3,48 2,37
	2	≤2,00 ≥4,23	≤2,00 ≥4,30	2,30 4,83	2,56 4,52	≤2,00 ≥3,48	≤2,00 ≥3,48	≤2,00 ≥5,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	n.d.	n.d.
40	1	n.d.	n.d.	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥3,48	≤2,00 ≥3,48	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥5,13	≤2,00 ≥3,48	≤2,00 ≥3,48	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	n.d.	n.d.
Viruskontrolle (log ₁₀ TCID ₅₀)		6,23	6,30/7,13	7,08/7,13	7,08/7,13	7,13/5,48	7,13/5,48	7,00/6,00	7,00/6,00	6,00	6,00	5,70	5,70/5,85

- Peressigsäure

Die Ergebnisse für Peressigsäure sind ausführlich in Tabelle 10 dargestellt. Mit Peressigsäure wurden 7 bis 11 Versuchsreihen im Zeitraum vom 12.04.2010 bis zum 27.06.2011 angelegt. Die Peressigsäure lag in 4 verschiedenen Konzentrationen von 0,001, 0,005, 0,01 und 0,05% vor. Die Einwirkzeit betrug 1 und 2 min. Die Viruskontrollen lagen vergleichbar mit den anderen Versuchsreihen zwischen 5,70 und 7,13 \log_{10} TCID₅₀/ml. In den Konzentrationen von 0,001% und 0,005% wurde unabhängig von der Einwirkzeit nur einmalig (0,005%, 2 min) ein RF von 4,00 \log_{10} ermittelt. Insgesamt lagen die Ergebnisse zwischen 0,62 und 4,00 \log_{10} . Bei Steigerung der Konzentration auf 0,01% wurden nach Einwirkungsdauer von 1 min RF zwischen 3,00 und 5,08 \log_{10} ermittelt. Nach Einwirkung von 2 min lagen diese zwischen 3,30 und 5,08 \log_{10} . Über 4,00 \log_{10} wurde die Titerreduktion in 8 von 10 Versuchen gesehen. In der Konzentration von 0,05% wurde nur in einem der 10 Versuche der RF von 4,00 \log_{10} nicht erreicht. Die Ergebnisse lagen zwischen $\geq 3,30$ und 5,80 \log_{10} .

Tab. 10: Ergebnisse der Testung von Peressigsäure in Konzentrationen von 0,001 bis 0,05% und Einwirkzeiten von 1 bis 2 min gegenüber DHBV

Konzentration (%)	Zeit (min)	Viruskonzentration in log ₁₀ der TCID ₅₀ /ml nach Substanzeinwirkung (Normalschrift) sowie Reduktionsfaktor (Fettschrift)										
		1.Versuch 12.04.10	2.Versuch 29.04.10	3.Versuch 03.05.10	4.Versuch 03.05.10	5.Versuch 03.05.10	6.Versuch 10.05.10	7.Versuch 10.05.10	8.Versuch 26.05.11	9.Versuch 07.06.11	10.Versuch 20.06.11	11.Versuch 27.06.11
0,001	1	5,68 0,62	5,76 1,32	5,70 1,43	5,57 1,56	5,62 1,51	5,74 1,26	5,18 1,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	5,54 0,76	5,32 1,76	5,48 1,65	5,20 1,93	5,38 1,75	5,23 1,77	4,81 2,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0,005	1	4,45 1,85	4,74 2,34	4,18 2,95	4,30 2,83	4,26 2,87	4,63 2,37	4,44 2,56	3,40 2,60	3,40 2,60	4,60 1,10	3,30 2,70
	2	3,00 3,30	4,60 2,48	3,78 3,35	4,04 3,09	4,00 3,13	4,28 2,72	4,24 2,76	3,00 3,00	2,00 4,00	2,95 2,75	3,00 3,00
0,01	1	3,00 3,30	2,00 5,08	3,60 3,53	3,96 3,17	3,85 3,28	3,00 4,00	3,00 4,00	3,00 3,00	2,30 3,70	2,70 3,00	3,00 3,00
	2	3,00 3,30	≤2,00 ≥5,08	≤3,00 ≥4,13	≤3,00 ≥4,13	≤3,00 ≥4,13	≤3,00 ≥4,00	≤3,00 ≥4,00	2,30 3,70	≤2,00 ≥4,00	n.d.	≤2,00 ≥4,00
0,05	1	≤3,00 ≥3,30	≤2,00 ≥5,08	≤3,00 ≥4,13	≤3,00 ≥4,13	≤3,00 ≥4,13	≤3,00 ≥4,00	≤3,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	n.d.	≤2,00 ≥4,00
	2	≤3,00 ≥3,30	≤2,00 ≥5,08	≤3,00 ≥4,13	≤3,00 ≥4,13	≤3,00 ≥4,13	≤3,00 ≥4,00	≤3,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	≤2,00 ≥4,00	n.d.	≤2,00 ≥4,00
Viruskontrolle (log ₁₀ TCID ₅₀)		6,30	7,08	7,13	7,13	7,13	7,00	7,00	6,00	6,00	5,70	6,00

- Formaldehyd

Die Ergebnisse zu Formaldehyd sind in Tabelle 11 dargestellt. Formaldehyd in der Konzentration von 0,7% wurde bei einer Einwirkzeit von 5 bis 60 min untersucht. Die Viruskontrollen lagen zwischen 5,48 und 7,08 log₁₀ TCID₅₀/ml. Insgesamt wurden 8 bis 12 Versuchsreihen im Zeitraum vom 12.04.2010 bis zum 07.06.2011 durchgeführt. In keiner Versuchsreihe, meist bedingt durch die hohe Zytotoxizität, wurde ein RF von 4,00 log₁₀ erreicht. Bei einer Einwirkzeit von 5 min ergaben sich Reduktionen der Virustiter von 1,35 bis 3,00 log₁₀. Bei 30 min lagen die Ergebnisse zwischen ≥3,00 und 3,18 log₁₀ und bei Steigerung auf 60 min ebenfalls zwischen ≥3,00 und 3,18 log₁₀.

Tab. 11: Ergebnisse der Testung von Formaldehyd in der Konzentration von 0,7% und Einwirkzeiten von 5 bis 60 min gegenüber DHBV

Konzentration (%)	Zeit (min)	Viruskonzentration in log ₁₀ der TCID ₅₀ /ml nach Substanzeinwirkung (Normalschrift) sowie Reduktionsfaktor (Fettschrift)											
		1.Versuch 12.04.10	2.Versuch 29.04.10	3.Versuch 03.05.10	4.Versuch 03.05.10	5.Versuch 03.05.10	6.Versuch 10.05.10	7.Versuch 10.05.10	8.Versuch 11.04.11	9.Versuch 02.05.11	10.Versuch 07.05.11	11.Versuch 26.05.11	12.Versuch 07.06.11
0,7	5	4,95 1,35	5,08 2,00	5,16 1,97	5,00 2,13	4,60 2,53	4,00 3,00	4,95 2,05	3,48 2,00	4,00 2,00	4,54 1,64	4,48 1,52	4,20 1,80
	30	n.d.	≤4,00 ≥3,08	≤4,00 ≥3,13	≤4,00 ≥3,13	≤4,00 ≥3,13	≤4,00 ≥3,00	≤4,00 ≥3,00	≤3,00 ≥3,00	≤3,00 ≥3,00	≤3,00 ≥3,18	≤3,00 ≥3,00	≤3,00 ≥3,00
	60	n.d.	≤4,00 ≥3,08	≤4,00 ≥3,13	≤4,00 ≥3,13	≤4,00 ≥3,13	≤4,00 ≥3,00	≤4,00 ≥3,00	n.d.	≤3,00 ≥3,00	≤3,00 ≥3,18	n.d.	n.d.
Viruskontrolle (log ₁₀ TCID ₅₀)		6,30	7,08	7,13	7,13	7,13	7,00	7,00	5,48/6,00	6,00	6,18	6,00	6,00

- Glutardialdehyd

Der Tabelle 12 sind die Ergebnisse mit Glutardialdehyd zu entnehmen. Die Viruskontrollen lagen zwischen 6,30 und 7,00 TCID₅₀/ml in jeweils 5 bis 6 Versuchsreihen im Zeitraum zwischen dem 12.04.2010 und dem 10.05.2010. In der Konzentration von 0,05% und einer Einwirkzeit des Desinfektionsmittel von 0,5 min ergaben sich Reduktionen des Virustiters zwischen 1,99 und 4,00 log₁₀. Der RF von 4,00 log₁₀ wurde in einer Versuchsreihe erreicht. Bei einer Einwirkzeit von 2 und 5 min wurden RF zwischen ≥4,00 und ≥4,08 log₁₀ ermittelt. Gleiche Ergebnisse sind ersichtlich bei einer Konzentration von 0,1%, unabhängig der gemessenen Einwirkzeit von 0,5, 2, oder 5 min.

Tab. 12: Ergebnisse der Testung von Glutardialdehyd in Konzentrationen von 0,05 und 0,1% und Einwirkzeiten von 0,5 bis 5 min gegenüber DHBV

Konzentration (%)	Zeit (min)	Viruskonzentration in \log_{10} der TCID ₅₀ /ml nach Substanzeinwirkung (Normalschrift) sowie Reduktionsfaktor (Fettschrift)					
		1.Versuch 12.04.10	2.Versuch 29.04.10	3.Versuch 29.04.10	4.Versuch 29.04.10	5.Versuch 10.05.10	6.Versuch 10.05.10
0,05	0,5	4,31 1,99	4,93 2,15	4,74 2,34	3,54 2,54	3,00 4,00	3,30 3,70
	2	n.d.	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$
	5	n.d.	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$
0,1	0,5	n.d.	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$
	2	n.d.	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$
	5	n.d.	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,08$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$	$\leq 3,00$ $\geq 4,00$
Viruskontrolle (\log_{10} TCID ₅₀)		6,30	7,08	7,08	7,08	7,00	7,00

4.3. Mittlere Reduktionsfaktoren der begrenzten Viruzidie der getesteten Desinfektionsmittel gegenüber dem Duck Hepatitis B Virus

Den Tabellen 13 bis 15 sind ausführlich die mRF einschließlich des 95%igen Konfidenzintervalls zu entnehmen. Für Ethanol 30% (Tab. 13) ergab sich nach 1 min ein mRF von $2,99 \pm 0,78 \log_{10}$ und nach Einwirkung von 2 min ein mRF von $3,46 \pm 0,64 \log_{10}$, was keinem ausreichenden viruziden Effekt entspricht ($RF < 4,00 \log_{10}$). In den Konzentrationen von 40 bis 70% Ethanol lagen die mRF unabhängig von der Einwirkzeit bei $\geq 4,00$ ($\geq 4,38$ bis $\geq 4,88$) \log_{10} .

Die mRF für Isopropanol sind ebenfalls in Tabelle 13 dargestellt. In der Konzentration von 20% Isopropanol bei einer Einwirkungsdauer von 1 min wurde ein mRF von $1,96 \pm 0,66 \log_{10}$ ermittelt. Nach 2 min bestand ein mRF von $2,33 \pm 0,61 \log_{10}$. Isopropanol in der Konzentration 30% und einer Einwirkung von 1 min ergab einen mRF von $3,39 \pm 0,81 \log_{10}$. Bei 30% Isopropanol und einer Einwirkzeit von 2 min sowie auch bei einer 40%igen Konzentration lagen die mRF stets bei $\geq 4,00$ ($\geq 4,15$ bis $\geq 4,18$) \log_{10} .

Tab. 13: Begrenzt viruzide Aktivität von Ethanol und Isopropanol gegenüber dem DHBV, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkzeit (min)	Mittlerer Reduktionsfaktor
Ethanol	30	1	2,99±0,78
		2	3,46±0,64
	40	1	$\geq 4,38$
		2	$\geq 4,42$
	50	1	$\geq 4,84$
		2	$\geq 4,88$
	60	1	$\geq 4,88$
		2	$\geq 4,88$
	70	1	$\geq 4,56$
		2	$\geq 4,56$
Isopropanol	20	1	1,96±0,66
		2	2,33±0,61
	30	1	3,39±0,81
		2	$\geq 4,18$
	40	1	$\geq 4,15$
		2	$\geq 4,15$

Für Peressigsäure in der Konzentration von 0,001% und Einwirkzeit von 1 min ergab sich ein mRF von $1,36 \pm 0,35 \log_{10}$ und nach 2 min ein mRF von $1,69 \pm 0,41 \log_{10}$. In der Konzentration von 0,005% wurden nach 1 und 2 min mRF von $2,43 \pm 0,51 \log_{10}$ bzw. $3,05 \pm 0,39 \log_{10}$ erreicht. Bei der Konzentration von 0,01% nach 1 min wurde ein mRF von $3,55 \pm 0,60 \log_{10}$ bestimmt. Nach 2 min und auch in der Konzentration von 0,05% fanden sich mRF von $\geq 4,05 \log_{10}$. Diese Ergebnisse sind Tabelle 14 zu entnehmen. Damit war ab den Konzentrationen von 0,01% (2 min) und 0,05% Peressigsäure ein viruzider Effekt nachweisbar.

Tab. 14: Begrenzt viruzide Aktivität von Peressigsäure gegenüber dem DHBV, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkzeit (min)	Mittlerer Reduktionsfaktor
Peressigsäure	0,001	1	$1,36 \pm 0,35$
		2	$1,69 \pm 0,41$
	0,005	1	$2,43 \pm 0,51$
		2	$3,05 \pm 0,39$
	0,01	1	$3,55 \pm 0,60$
		2	$\geq 4,05$
	0,05	1	$\geq 4,05$
		2	$\geq 4,05$

Für Formaldehyd in der Konzentration von 0,7% ergab sich bei einer Einwirkzeit von 5 min ein mRF von $2,00 \pm 0,42 \log_{10}$. Nach 30 min bestand ein mRF von $\geq 3,06 \log_{10}$ und nach 60 min von $\geq 3,08 \log_{10}$ (Tab. 15). Durch Formaldehyd wurde damit keine Titerreduktion von $\geq 4,00 \log_{10}$ nachgewiesen.

Die mRF für Glutardialdehyd sind in Tabelle 15 dargestellt. In der Konzentration von 0,05% und Einwirkzeit von 0,5 min bestand ein mRF von $2,79 \pm 0,78 \log_{10}$. Für Glutardialdehyd ergab sich ein mRF von $4,05 \log_{10}$ in der Konzentration von 0,05% bei Einwirkzeiten von 2 und 5 min sowie für 0,1%iges Glutardialdehyd bei Einwirkung des Desinfektionsmittels für 0,5, 2 und 5 min. Die Titerreduktion von $\geq 4,00 \log_{10}$ entspricht einem viruziden Effekt in den angegebenen Konzentrationen und Zeiten für Glutardialdehyd.

Tab. 15: Begrenzt viruzide Aktivität von Formaldehyd und Glutardialdehyd gegenüber dem DHBV, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkzeit (min)	Mittlerer Reduktionsfaktor
Formaldehyd	0,7	5	$2,00 \pm 0,42$
		30	$\geq 3,06$
		60	$\geq 3,08$
Glutardialdehyd	0,05	0,5	$2,79 \pm 0,78$
		2	$\geq 4,05$
		5	$\geq 4,05$
	0,1	0,5	$\geq 4,05$
		2	$\geq 4,05$
		5	$\geq 4,05$

4.4. Mittlere Reduktionsfaktoren der begrenzten Viruzidie der getesteten Desinfektionsmittel gegenüber dem Vacciniavirus und dem Modified Vaccinia Virus Ankara

Die Ergebnisse sind zusammenfassend in der Tabelle 16 dargestellt. Für Ethanol wurde eine konzentrationsabhängige Virusinaktivierung gegenüber Vacciniavirus und MVA gesehen. Für beide Viren bestand für Ethanol in der Konzentration ab 40% und einer Einwirkzeit von 2 min sowie bei einer Konzentration von 50 bis 70% ein mRF von $\geq 4,00$ ($\geq 4,59$ bis $\geq 5,76$) \log_{10} und somit eine komplette Virusinaktivierung. Ethanol 30% mit Einwirkzeiten von 1 und 2 min sowie in der Konzentration 40% und einer Einwirkung von 1 min ergab mRF unterhalb 4,00 ($-0,10 \pm 0,29$ bis $\geq 3,28$) \log_{10} . Bei Isopropanol wurde in den Konzentrationen von 20 und 30% keine Virusinaktivierung um 4,00 \log_{10} erreicht. Für Isopropanol in der Konzentration von 40% wurde ein mRF für Vacciniavirus und MVA von $\geq 4,00$ ($\geq 4,76$ bis $\geq 5,11$) \log_{10} bestimmt. Durch Peressigsäure wurde in der Konzentration von 0,001% und einer Einwirkzeit von 1 und 2 min bei Vacciniavirus und MVA lediglich ein mRF von $0,74 \pm 0,27$ bis $1,79 \pm 0,30$ \log_{10} erreicht und damit keine ausreichende Titerreduktion von $\geq 4,00$ \log_{10} . In den Konzentrationen von 0,005 bis 0,05% wurde bei Einwirkung von 1 und 2 min für Vacciniavirus und MVA ein mRF von $\geq 4,00$ ($\geq 4,15$ bis $\geq 5,66$) \log_{10} ermittelt und damit eine ausreichende begrenzte Viruzidie erreicht.

Tab. 16: Begrenzt viruzide Aktivität von Ethanol, Isopropanol und Peressigsäure gegenüber dem Vacciniavirus bzw. dem MVA, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift (Rabenau et al. 2010)

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkzeit (min)	Mittlerer Reduktionsfaktor	
			Vacciniavirus	MVA
Ethanol	30	1	-0,10±0,29	0,01±0,26
		2	0,32±0,28	-0,01±0,30
	40	1	$\geq 3,28$	2,94±0,27
		2	$\geq 4,59$	$\geq 4,05$
	50	1	$\geq 5,11$	$\geq 4,76$
		2	$\geq 5,11$	$\geq 5,76$
	60	1	$\geq 5,11$	$\geq 5,76$
		2	$\geq 5,11$	$\geq 5,76$
Isopropanol	20	1	0,01±0,29	0,08±0,25
		2	-0,01±0,30	-0,04±0,30
	30	1	1,63±0,30	1,35±0,22
		2	1,87±0,26	2,67±0,27
	40	1	$\geq 5,11$	$\geq 4,76$
		2	$\geq 5,11$	$\geq 4,76$
Peressigsäure	0,001	1	0,74±0,31	0,74±0,27
		2	1,62±0,30	1,79±0,30
	0,005	1	$\geq 4,50$	$\geq 5,66$
		2	$\geq 4,50$	$\geq 5,66$
	0,01	1	$\geq 4,48$	$\geq 4,85$
		2	$\geq 4,48$	$\geq 4,85$
	0,05	1	$\geq 4,15$	$\geq 4,35$
		2	$\geq 4,15$	$\geq 4,35$

Die Ergebnisse für Formaldehyd und Glutardialdehyd sind in Tabelle 17 dargestellt. Für Formaldehyd in der Konzentration 0,7% konnten bei einer Einwirkzeit von 5 bis 60 min für beide Viren keine mRF von $\geq 4,00 \log_{10}$ nachgewiesen werden. Die mRF lagen bei 60 min Anwendung für Vacciniavirus bei $\geq 3,61 \log_{10}$ und bei MVA bei $\geq 2,14 \log_{10}$. Mit Glutardialdehyd konnte für das MVA in den Konzentrationen 0,05 und 0,1% unabhängig von der Einwirkzeit von 0,5 bis 5 min ebenfalls keine Titerreduktion von $\geq 4,00 \log_{10}$ nachgewiesen werden. Die mRF lagen zwischen $1,14 \pm 0,29$ bis $\geq 3,82 \log_{10}$. Für Vacciniavirus wurden in der Konzentration von 0,05 und 0,1% bei Einwirkung von 2 und 5 min mRF von $\geq 4,35 \log_{10}$ ermittelt. Für Glutardialdehyd in einer Konzentration von 0,05 und 0,1% und einer Einwirkzeit von 0,5 min war für Vacciniavirus und MVA keine ausreichende Virusinaktivierung nachzuweisen (mRF von $1,62 \pm 0,25$ bis $2,91 \pm 0,22 \log_{10}$).

Tab. 17: Begrenzt viruzide Aktivität von Formaldehyd und Glutardialdehyd gegenüber dem Vacciniavirus bzw. dem MVA, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift (Rabenau et al. 2010)

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkzeit (min)	Mittlerer Reduktionsfaktor	
			Vacciniavirus	MVA
Formaldehyd	0,7	5	1,15 \pm 0,28	$\geq 2,09$
		30	$\geq 2,62$	$\geq 2,14$
		60	$\geq 3,61$	$\geq 2,14$
Glutardialdehyd	0,05	0,5	1,62 \pm 0,25	1,14 \pm 0,29
		2	$\geq 4,35$	$\geq 3,82$
		5	$\geq 4,35$	$\geq 3,82$
	0,1	0,5	2,91 \pm 0,22	2,21 \pm 0,25
		2	$\geq 4,35$	$\geq 3,82$
		5	$\geq 4,35$	$\geq 3,82$

4.5. Direkter Vergleich der begrenzten Viruzidie der getesteten Desinfektionsmittel gegenüber dem Duck Hepatitis B Virus sowie dem Vacciniavirus bzw. dem Modified Vaccinia Virus Ankara

Die mRF zu DHBV (Tab. 13 bis 15) und zu Vacciniavirus bzw. MVA (Tab.16 und 17) wurden für die 5 eingesetzten Desinfektionsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten direkt verglichen.

Die Abbildung 13 zeigt den Vergleich der Wirksamkeit von Ethanol gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA. Ethanol in einer Konzentration von 30% zeigte nach 1 und 2 min eine bessere Wirksamkeit gegenüber DHBV, aber unterhalb der geforderten Reduktion von $\geq 4,00 \log_{10}$. Dagegen zeigte 30% Ethanol keine Wirksamkeit gegenüber Vacciniavirus und MVA. Durch Ethanol 40% bei einer Einwirkzeit von 2 min sowie in den Konzentrationen von 50 und 60% wurde eine vergleichbare Virusinaktivierung von $\geq 4,00 \log_{10}$ für DHBV, Vacciniavirus und MVA erreicht. Das DHBV konnte im Gegensatz zu Vacciniavirus und MVA schon nach 1 min Einwirkzeit von 40% Ethanol ausreichend inaktiviert werden. Auf eine isolierte Betrachtung der Konzentration von Ethanol 70% in der DHBV-Testung wurde wegen der fehlenden Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Rabenau et al. (2010) verzichtet. Insgesamt zeigte Ethanol in den Konzentrationen 30% nach 1 und 2 min sowie in der Konzentration 40% bei 1 min Einwirkzeit eine bessere Wirkung gegenüber DHBV als gegenüber Vacciniavirus und MVA.

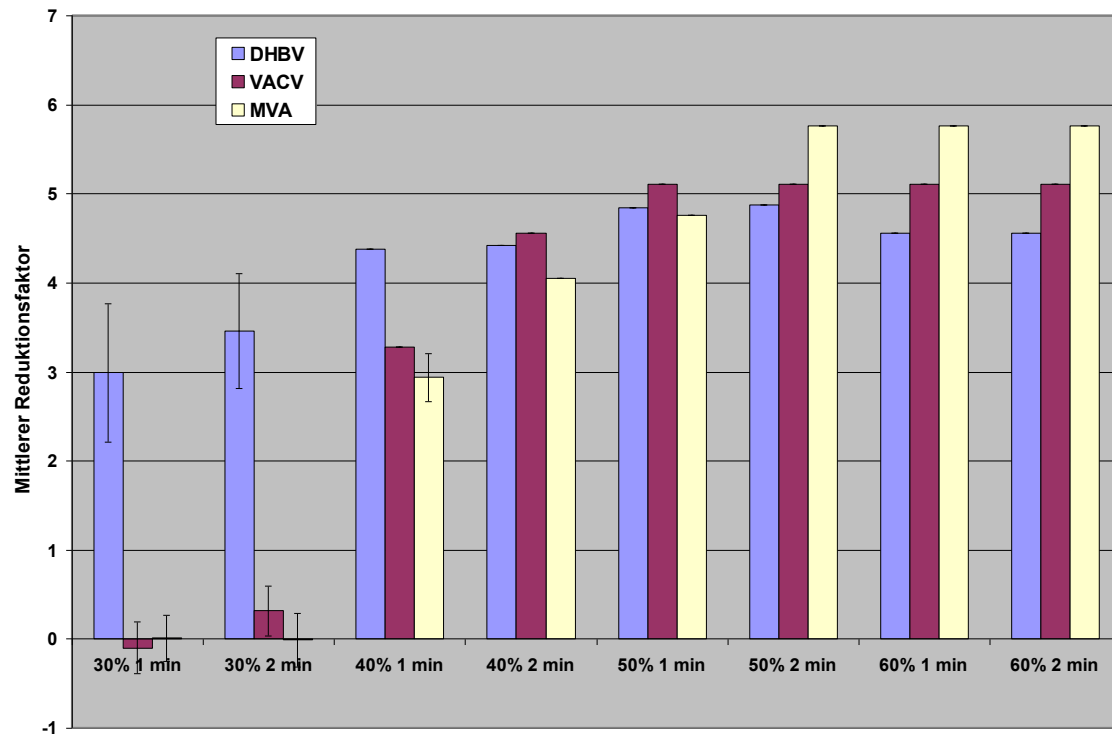


Abb. 13: Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von Ethanol gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA

Der Vergleich von Isopropanol gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA ist in der Abbildung 14 dargestellt. In der Konzentration 20% des Wirkstoffs Isopropanol sowie der Konzentration von 30% bei einer Einwirkzeit von 1 bis 2 min bestanden mRF von $1,96 \pm 0,66$ bis $\geq 4,18 \log_{10}$ gegenüber DHBV. Dies bedeutet, dass für DHBV ab 30% Isopropanol über eine Einwirkdauer von 2 min ein viruzider Effekt vorlag. Im Gegensatz dazu war bei Einwirkung von 20 und 30% Isopropanol über 1 und 2 min lediglich eine Titerreduktion von $-0,01 \pm 0,30$ bis $1,87 \pm 0,26 \log_{10}$ gegenüber Vacciniavirus und von $-0,04 \pm 0,30$ bis $2,67 \pm 0,27 \log_{10}$ gegenüber MVA nachweisbar. In der Konzentration von 40% Isopropanol wurden DHBV, Vacciniavirus und MVA vergleichbar suffizient inaktiviert. Insgesamt zeigte sich in den Konzentrationen von 20% und 30% Isopropanol die Wirksamkeit gegenüber DHBV geringfügig besser. Ab einer Konzentration von 40% Isopropanol bestand eine vergleichbare Effizienz.

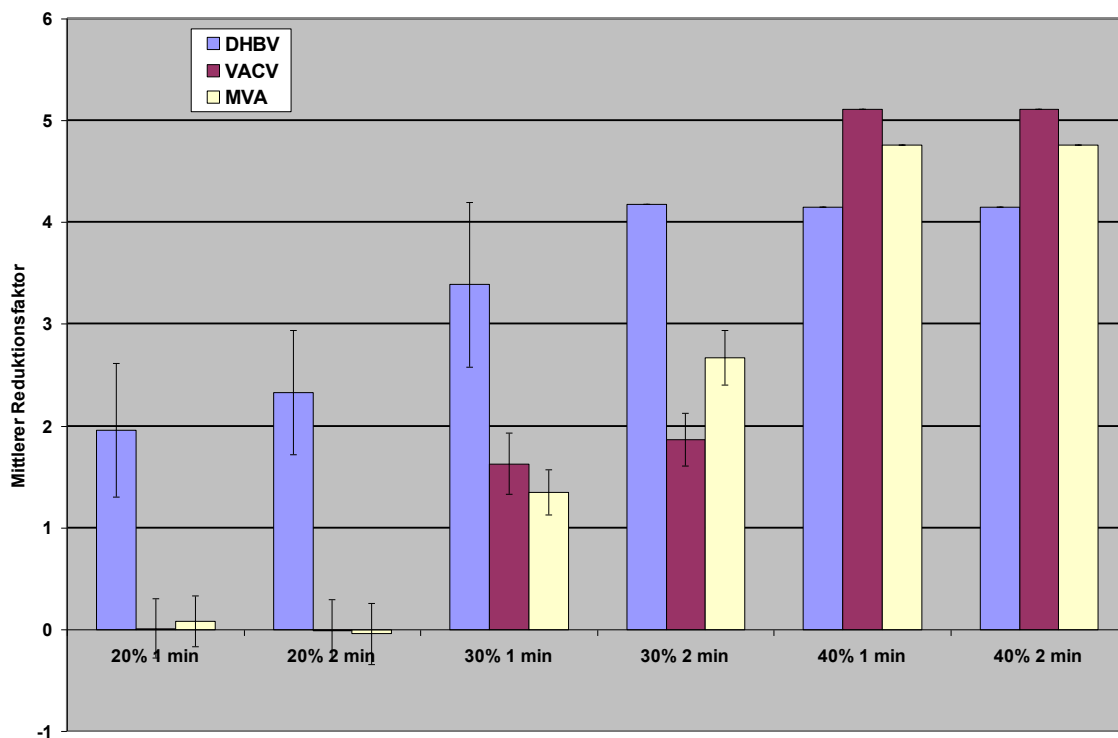


Abb. 14: Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von Isopropanol gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA

Die Gegenüberstellung der Wirkung von Peressigsäure ist Abbildung 15 zu entnehmen. Keine suffiziente Inaktivierung von DHBV wurde durch Peressigsäure in den Konzentrationen von 0,001 und 0,005% bei einer Einwirkzeit von 1 und 2 min gesehen ($mRF\ 1,36\pm0,35$ bis $3,05\pm0,39\ log_{10}$). Auch in der Konzentration von 0,01% und Einwirkung von 1 min wurde keine vollständige Inaktivierung von DHBV ermittelt ($mRF\ 3,55\pm0,60\ log_{10}$). Ab einer Konzentration von 0,01% und 2 min Einwirkung sowie bei einer Konzentration von 0,05% lag unabhängig von der Einwirkungszeit der mRF bei $\geq 4,05\ log_{10}$. Im Gegensatz dazu ist Peressigsäure ab einer Konzentration von 0,005% in der Lage, sowohl Vacciniavirus und auch MVA sicher zu eliminieren ($mRF\ \geq 4,15$ bis $\geq 5,66\ log_{10}$). In der Konzentration von 0,001% war dies noch nicht der Fall. Dies bedeutet, dass Peressigsäure in Konzentrationen von 0,005 und 0,01% eine geringfügig bessere Wirksamkeit gegenüber Vacciniavirus und MVA als gegenüber DHBV besitzt. Höhere Konzentrationen bzw. längere Einwirkzeiten (0,01%, 2 min) bewirken eine vergleichbare Virusinaktivierung.

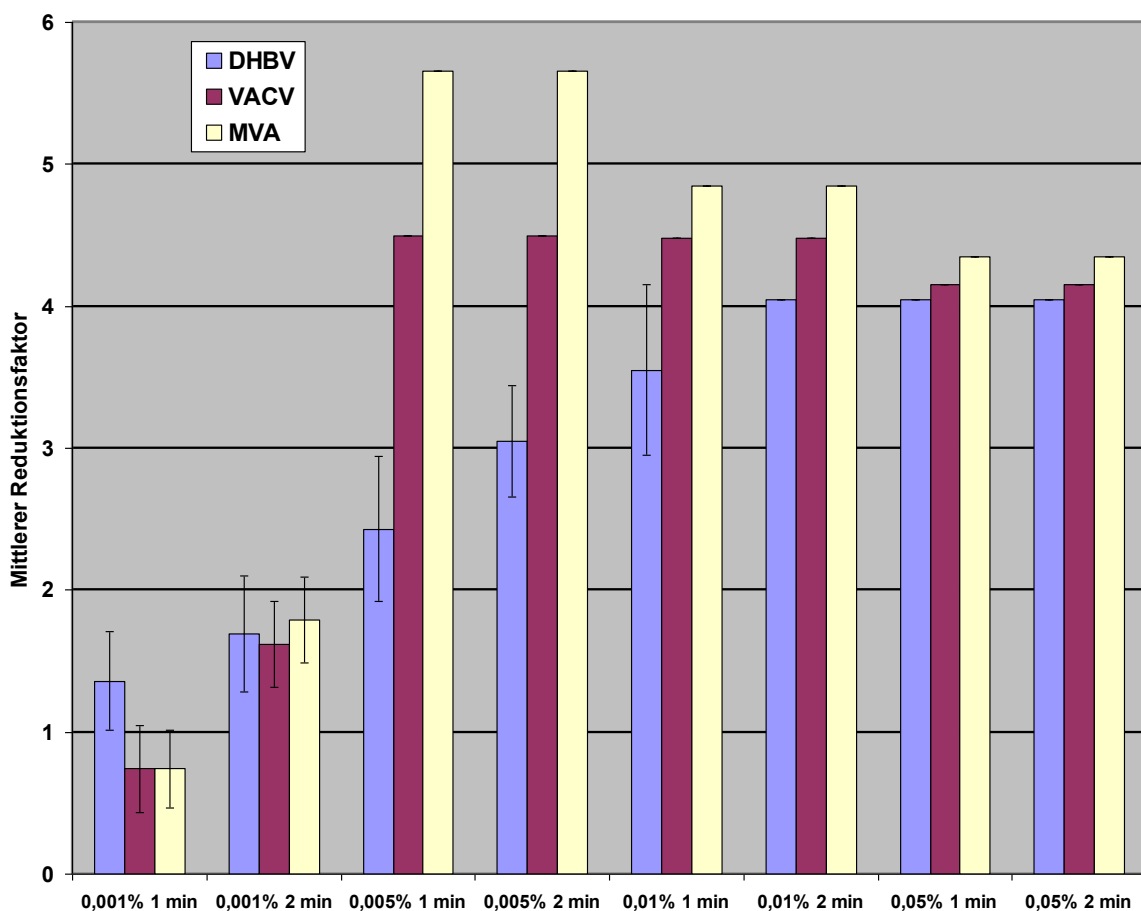


Abb. 15: Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von Peressigsäure gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA

Der Vergleich von Formaldehyd ist Abbildung 16 zu entnehmen. Durch Formaldehyd 0,7% wurden bei einer Einwirkung von 5 bis 60 min gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA vergleichbare Titerreduktionswerte zwischen $2,00 \pm 0,42$ und $\geq 3,08 \log_{10}$ ermittelt. Bedingt durch die ausgeprägte Zytotoxizität von Formaldehyd konnte für alle Testviren keine ausreichende Virusinaktivierung von $\geq 4,00 \log_{10}$ erreicht werden.

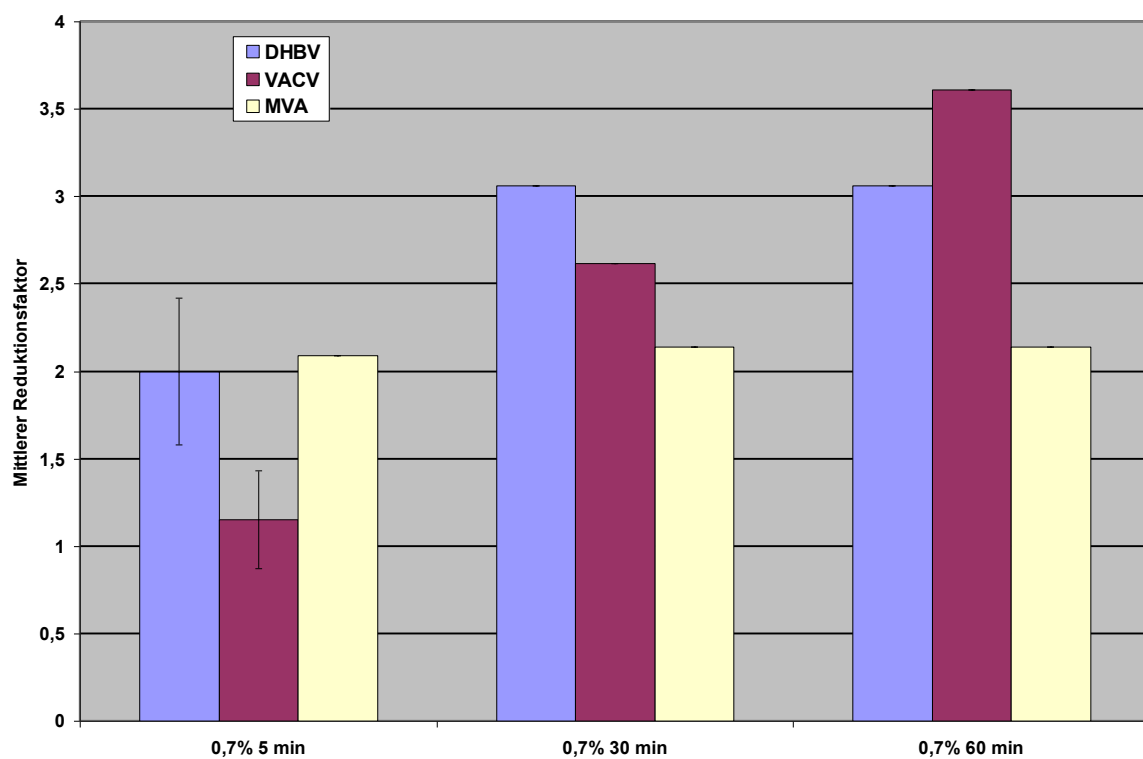


Abb. 16: Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von Formaldehyd gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA

Der Vergleich von Glutardialdehyd ist in Abbildung 17 dargestellt. Durch Glutardialdehydeinwirkung über 0,5 min in einer Konzentration von 0,05% ergab sich für DHBV ein mRF von $2,79 \pm 0,78 \log_{10}$. Ab einer Einwirkzeit von 2 min bei einer Konzentration von 0,05% wurde eine ausreichende Virusinaktivierung gegenüber DHBV erreicht ($\text{mRF} \geq 4,05 \log_{10}$). In Übereinstimmung damit zeigte 0,05% Glutardialdehyd innerhalb von 0,5 min ebenfalls keine ausreichende virusinaktivierende Wirkung gegenüber Vacciniavirus und MVA ($\text{mRF} 1,14 \pm 0,29$ bis $1,62 \pm 0,25 \log_{10}$). Längere Einwirkzeiten von 2 min und 5 min sowie höhere Konzentration von 0,1% zeigten mit Ausnahme von 0,1% und 0,5 min ($\text{mRF} 1,62 \pm 0,25$ bzw. $2,91 \pm 0,22 \log_{10}$) vergleichbare Ergebnisse zum DHBV, obwohl durch die Zytotoxizität von Glutardialdehyd keine Titerreduktionen von $\geq 4,00 \log_{10}$ nachweisbar waren.

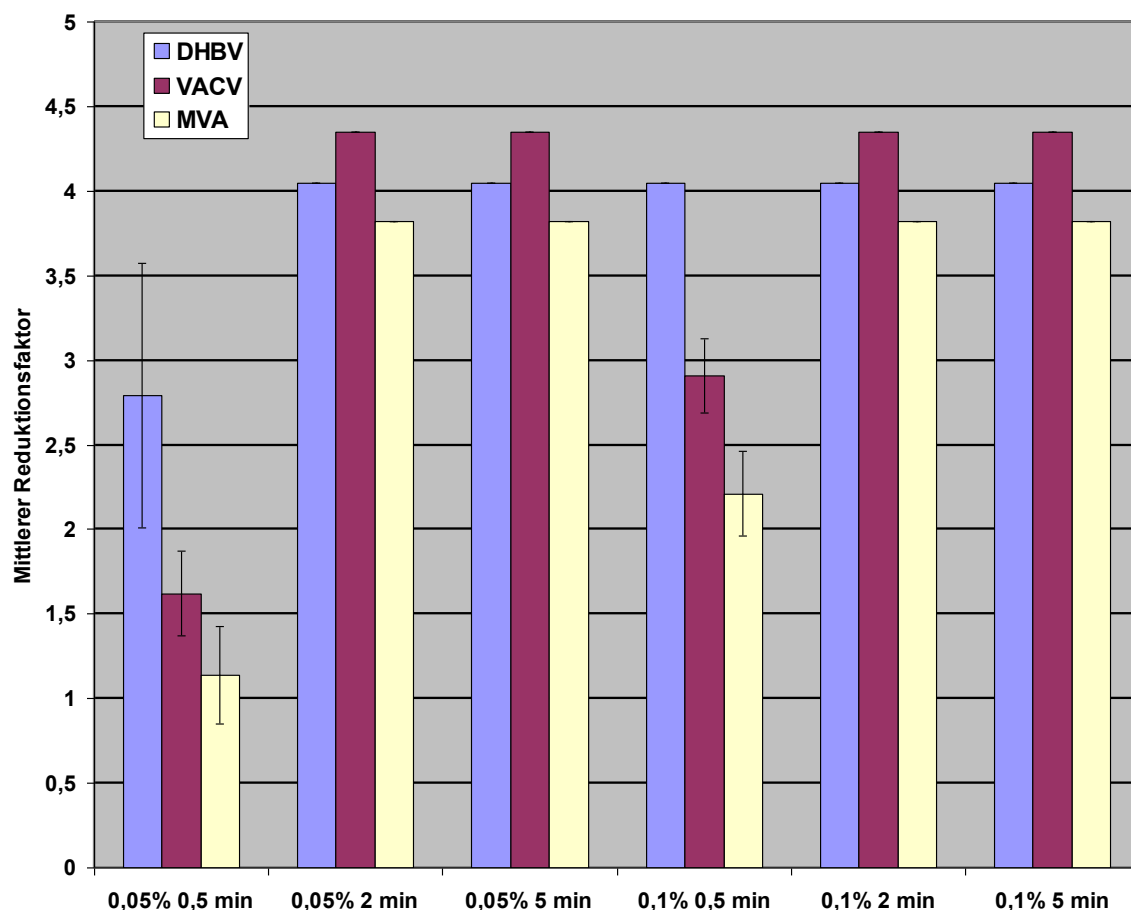


Abb. 17: Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von Glutardialdehyd gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA

5. Diskussion

Desinfektionsmaßnahmen tragen durch die Unterbrechung von Infektketten in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen entscheidend zur Prävention von nosokomialen Virusinfektionen bei. Entsprechend wichtig sind viruswirksame Desinfektionsmittel, die zur Hände-, Oberflächen- und Instrumentendesinfektion verwendet werden können. Anders als Bakterien haben Viren ein sehr unterschiedliches Resistenzverhalten gegenüber chemischen Substanzen, so dass es das „optimale“ Desinfektionsmittel für alle Virusinfektionen nicht gibt.

Heterogenität der Viren

Dass eine solche Heterogenität selbst in einer Virusfamilie bestehen kann, zeigen Untersuchungen mit Adenoviren, die große Unterschiede bezüglich der Chemoresistenz gegen Polyvinylpyrrolidon-Jod, Peressigsäure und Formaldehyd innerhalb der getesteten Virusstämme ergaben (Sauerbrei et al. 2004).

Für jedes Desinfektionsmittel ist der Nachweis der Viruswirksamkeit zu erbringen, wobei die Anforderungen an das Präparat von den Eigenschaften der jeweiligen Viren und den Anwendungsbedingungen bestimmt werden. Die Prüfung auf Viruzidie kann nur mit virologischen Methoden vorgenommen werden. In der Regel erfolgen die Untersuchungen im quantitativen Suspensionstest, der die Infektiosität vor und nach Einwirkung eines Desinfektionsmittels durch Verimpfung des Testgemisches auf ein virusempfindliches Wirtssystem vergleichend bestimmt. Allerdings simuliert der quantitative Suspensionsversuch weitestgehend nicht die in der klinischen Praxis üblichen Bedingungen, was bei der Interpretation der Befunde berücksichtigt werden muss.

Die vom Arbeitskreis „Viruzidie“ beim RKI (Arbeitskreis Viruzidie 2004) vorgenommene Einteilung der Viren hinsichtlich ihrer Widerstandsfähigkeit gegen Desinfektionsmittel in „begrenzt viruzid“ als wirksam gegen behüllte Viren und als „viruzid“ mit zusätzlicher Wirksamkeit gegen unbehüllte Viren hat sich in der Praxis bewährt. Der Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“ ermöglicht den Einsatz einer breiteren Wirkstoff- bzw. Produktpalette mit einer meist besseren Verträglichkeit, was insbesondere bei Händedesinfektionsmitteln eine Verbesserung der Compliance zur Folge hat (Schwebke und Rabenau 2012).

Von Bedeutung ist auch die Festlegung repräsentativer Prüfviren mit charakteristischen Eigenschaften. Sie sollten idealerweise Vertreter klinisch relevanter Viren sein, unterschiedliche biochemische Eigenschaften aufweisen und keine Gefährdung für das Laborpersonal darstellen (Schwebke und Rabenau 2012). Außerdem sollten hohe Virustiter der Prüfviren erreichbar und gut reproduzierbare Nachweissysteme verfügbar sein.

Bei der Bewertung der Prüfergebnisse ist zu bedenken, dass die Deklaration „viruzid“ nicht alle bekannten pathogenen Viren einschließt. Beispielsweise können unter Umständen das Hepatitis A-Virus und Parvoviren eine höhere Resistenz aufweisen als die eingesetzten Prüfviren (Blümel et al. 2008).

Ein besonderes Interesse gilt den klinisch relevanten umhüllten Viren HIV, HCV und HBV, die durch Blut, andere Körperflüssigkeiten und Gewebe übertragen werden können und gleichermaßen eine Infektionsgefahr für Patienten und medizinisches Personal darstellen. Da sich diese Viren in konventionellen Zellkulturen nicht replizieren, erfolgt die Prüfung von Desinfektionsmitteln für die Deklaration „begrenzt viruzid“ unter Verwendung der Testviren BVDV und Vacciniavirus, die einen Rückschluss auf HIV, HCV und HBV zulassen (Arbeitskreis Viruzidie 2004). Inwieweit sich die mit Surrogatviren erhobenen Befunde tatsächlich auf die jeweiligen Erreger übertragen lassen, wird immer wieder hinterfragt. Kontrovers diskutiert wurde daher vor allem die Aussagekraft der Prüfverfahren mit Surrogatviren für das HBV, das bei hoher Viruslast ein großes Gefährdungspotenzial besitzt (Arbeitskreis Viruzidie 2004). So kann z.B. mit einem Milliliter Plasma, das aus einem Pool von HBs-Ag-positiven Plasmen stammt, in der Verdünnung von $1:10^8$, nach intravenöser Verabreichung noch eine Infektion übertragen werden (Gerlich et al. 2012).

Duck Hepatitis B Virus als Testvirus für begrenzt viruzide Desinfektionsmittel

Aus chirurgischem Resektionsmaterial gewonnene Hepatozyten waren über viele Jahre die einzigen für HBV suszeptiblen Zellsysteme (Gripon et al. 1988). Das HBV infiziert jedoch in vitro nur sehr mangelhaft primäre humane Hepatozytenkulturen. Daher wurde als einzig stringentes Verfahren zum Nachweis der viruziden Wirkung von Desinfektionsmitteln gegenüber HBV die Infektion von Schimpansen angewendet. Desinfektionsmitteltestungen an Schimpansen, die 1983 von Bond und Mitarbeitern (Bond et al. 1983) durchgeführt wurden, konnten klarstellen, dass das

HBV nicht, wie anfangs vermutet, das gefürchtete „Supervirus“ mit einem Resistenzverhalten wie Sporen oder Tuberkulose-Erreger ist.

Es wurde auch versucht, die Bestimmung der Infektiosität des HBV auf der Basis von Hepatomzelllinien durchzuführen. Der Einsatz der Hepatomzelllinie HepG2 hat sich letztendlich aber in Desinfektionsmitteltestung jedoch als sehr fraglich erwiesen (Payan 2001). Reproduzierbare Ergebnisse bei der Bestimmung der Infektiosität des HBV ergaben Untersuchungen mit der redifferenzierten Hepatomzelllinie HepaRG (Gripon et al. 2002). Allerdings ist dieses Zellkultursystem bislang noch nicht zur Evaluierung der Viruzidie von Desinfektionsmittel eingesetzt worden. Auf der Suche nach geeigneten Zellkultursystemen zur Prüfung der Infektiosität von HBV bei der Desinfektionsmitteltestung wurden auch verschiedene tierische Zellkulturen erprobt, so z. B. primäre Hepatozytenkulturen von Tupaia (Köck et al. 2001, Glebe et al. 2003, Gerlich und Glebe 2004). Diese in Südostasien vorkommenden Eichhörnchen-artigen Tiere können experimentell mit HBV infiziert werden (Walter et al. 1996). In vitro sind primäre Hepatozytenkulturen für das humane HBV empfänglich (Walter et al. 1996, Glebe et al. 2003, Jursch et al. 2002). Als nachteilig erwies sich, dass das Tupaia-Modell mit hohen Kosten verbunden ist, entsprechende Hepatozyten in Europa nur sehr begrenzt verfügbar sind und eine Viruzidietestung die Verfügbarkeit hochtitriger HBV-positiver Serumproben von HBV-Carriern erfordert (Arbeitskreis Blut 2000).

Eingang in die routinemäßige Prüfung von Desinfektionsmitteln gegen HBV hat bislang sowohl der Suspensionstest mit DHBV und primären Entenhepatozyten als auch die In vivo-Testung an Entenküken (USA, Australien) gefunden. Ein entscheidender Vorteil von in vitro-Tests ist, dass sie keiner Anzeigepflicht laut Tierschutzgesetz unterliegen. Seit ca. 20 Jahren wird in den USA und Australien das DHBV als Surrogatvirus für das HBV zur Prüfung der Viruzidie von Desinfektionsmitteln eingesetzt (Environmental Protection Agency 2000, Murray et al. 1991, Chaufour et al. 1999). In Deutschland ist nach wie vor neben dem BVDV das Vacciniavirus als Surrogatvirus für behüllte Viren wie das HBV vorgeschrieben. Mit der vorliegenden vergleichenden Testung von DHBV und Vacciniavirus sollte deshalb geklärt werden, ob zur Prüfung von Desinfektionsmitteln auf begrenzt viruzide Wirksamkeit DHBV als separates Testvirus eingesetzt werden sollte.

Als Desinfektionsmittel wurden Ethanol, Isopropanol, Peressigsäure, Formaldehyd und Glutardialdehyd in unterschiedlichen Konzentrationen (außer Formaldehyd) und in der Praxis üblichen Einwirkzeiten getestet. Es handelt sich dabei um Wirkstoffe, die häufig Bestandteil kommerzieller Desinfektionsmittel sind. Um unterscheiden zu können, ob toxische Effekte in der Zellkultur vom Virus oder vom Desinfektionsmittel herrühren, muss der Grad der Zellschädigung bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die zu diesem Zweck durchgeführte Bestimmung der Zytotoxizität zeigte die zu erwartende unterschiedliche zelltoxische Wirkung der Prüfsbstanzen. So traten bei der Anwendung von Formaldehyd in einer Konzentration von 0,7% bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} zelltoxische Veränderungen auf ($\log_{10} \text{CD}_{50}/\text{ml} = \leq 4,00$), dies unabhängig von der Einwirkzeit. Besser toleriert wurde Glutardialdehyd mit einer Zytotoxizität von $\leq 3,00 \log_{10}$. Dieser Wert wurde auch mit 0,01 und 0,05%iger Peressigsäure bei 1 und 2 min Einwirkzeit gemessen. Ethanol und Isopropanol unterschieden sich nicht in Bezug auf die zelltoxische Wirkung, die nach 1 und 2 min bei $\leq 2,00 \log_{10}$ lag. Beide Alkohole zeichneten sich damit durch eine deutlich bessere Zellverträglichkeit als die geprüften Aldehyde und Peressigsäure aus. Dies stellt eine wesentliche Erleichterung in der praktischen Prüfung von Desinfektionsmitteln auf ihre viruzide Wirkung dar, da meist mit nicht aufkonzentrierten Virussuspensionen gearbeitet werden kann.

Die zellschädigenden Effekte der Desinfektionsmittel, die auch von der Sensitivität der verwendeten Zellkulturen abhängen, beeinträchtigen die Aussagekraft der Prüfverfahren. Wenn die Zytotoxizität des Desinfektionsmittels hoch ist, kann u.U. eine Abnahme des Infektionstiters um $4,00 \log_{10}$ nicht erfasst werden. In diesen Fällen sehen die Prüfbestimmungen von DVV/RKI (Blümel et al. 2008) vor, nach Ablauf der Einwirkzeit geeignete Methoden, wie Gelfiltration, Mikrofiltration oder Enthemmungsmittel, zur Minderung der Zytotoxizität einzusetzen. Allerdings sind diese Verfahren nicht unumstritten (DVV 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde das Molekularsiebverfahren angewendet (Valot et al. 2000), das die Zytotoxizität in Abhängigkeit von dem jeweiligen Wirkstoff in der Regel um eine \log_{10} -Stufe verringern kann.

Für die Testungen waren die Desinfektionsmittelkonzentrationen und -einwirkzeiten so gewählt worden, dass die Kinetik der Virusinaktivierung von „nicht wirksam“ bis zu „wirksam“ dargestellt werden konnte. Um Praxisbedingungen möglichst nahe zu

kommen, wurde die Wirkung der Prüfsubstanzen unter „Proteinlast“, d.h. unter Zusatz von 10% FKS durchgeführt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Virussuspension noch zusätzliche Proteinbestandteile enthielt, da sie in Form eines DHBV-haltigen Entenserums eingesetzt wurde.

In den Untersuchungen mit DHBV wurde eine viruzide Wirksamkeit von mindestens $4,00 \log_{10}$ für Ethanol, Isopropanol, Peressigsäure und Glutardialdehyd nachgewiesen. Für das in der Anwendungskonzentration toxische Formaldehyd wurde ein RF von $4,00 \log_{10}$ nicht erreicht. Legt man die von Pugh et al. (1999) und Murray et al. (1991) für den viruziden Effekt der Prüfsubstanzen gegen DHBV angenommene Reduktion des Virustiters um mindestens 3 \log_{10} -Stufen zu Grunde, ergibt sich für Formaldehyd nach 30 min und 60 min Einwirkung ein viruzider Effekt.

Dass die Ergebnisse der Viruzidieprüfung auch von der Herkunft der Testviren abhängig sind, haben Untersuchungen gezeigt, bei denen DHBV von D2-Zellen mit DHBV aus dem Serum kongenital infizierter Enten verglichen wurden (Sauerbrei et al. 2006). Suspensionen der D2-Zelllinie, die durch Transfektion der aviären Lebertumor-Zelllinie LMH mit einem pCMDHBV-Plasmids etabliert wurde, enthalten ebenso viele infektiöse Viruspartikel wie das Serum kongenital infizierter Enten (Condreay et al. 1990). Ein entscheidender Vorteil gegenüber dem Wildvirus ist, dass das D2-Virus in unbegrenzter Menge und zeitlich unabhängig hergestellt werden kann. Desinfektionsversuche ergaben jedoch, dass DHBV von D2-Zellen empfindlicher reagierten als die natürlich vorkommenden Viren, so dass nur letztere für Viruzidieprüfungen geeignet sind (Sauerbrei et al. 2006).

In zahlreichen DHBV-Modellen wird die Infektiosität der Proben in vivo durch Inokulation von Peking-Entenküken bestimmt (Murray et al. 1991, Tsiquaye und Bernard 1993, Deva et al. 1996). Nach einigen Wochen wird im Serum der Tiere die virale DNA gemessen. In vitro-Untersuchungen nutzen die empfänglichen Zellkulturen von Peking-Enten zur Virustiterbestimmung. Allerdings kann dabei die klassische Bestimmung der Infektionsherde nicht angewendet werden, da DHBV, wie alle Hepadnaviren, die infizierten Zellen im Verlauf der Replikation nicht zerstören. Deshalb wurden zur Detektion des DHBV in Zellkulturen häufig DNA-Nachweisverfahren angewendet (Wang et al. 2002a, 2002b), die jedoch keinen Rückschluss auf das Vorhandensein infektiöser Viruspartikel erlauben.

Sauerbrei et al. (2005) entwickelten speziell für die Quantifizierung der DHBV-DNA eine Real-Time-PCR, mit der auf die genomische Integrität des DHBV geschlossen werden kann. Das hat insofern Bedeutung, als dass die virale DNA intakt bleiben kann, wenn das Virus nicht mehr infektiös ist. So wurde an Oberflächen medizinischer Geräte DHBV-DNA nachgewiesen, ohne dass die Instrumente infektiös waren (Deva et al. 1996).

Eine Verbesserung der Nachweisverfahren wurde mit der Einführung der indirekten Immunfluoreszenztechnik zur Darstellung der von virusproduzierenden Zellen gebildeten DHBs-Ag erreicht. Voraussetzung für diese Methode ist die Verfügbarkeit eines polyvalenten Antiserums, mit dem das in der Spätphase der Virusreplikation gebildete DHBs-Ag reagiert. Die Synthese des DHBs-Ag korreliert mit der Bildung reifer Viruspartikel (Gerlich 1991). Diese Methode wurde in den vorliegenden Experimenten zur Bestimmung des Virustiters in den mit Desinfektionsmitteln behandelten Proben und den entsprechenden hemmstofffreien Kontrollansätzen angewendet. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Zellkulturen zeigte, dass die infizierten Zellen typischerweise in Inseln angeordnet waren (Abb. 12). Cluster virusreplizierender Zellen wurden bei Infektionsversuchen an Enten häufig während der Frühphase der Infektion in Leberzellen nachgewiesen (Jilbert et al. 1988) und auch in primären Hepatozytenkulturen festgestellt (Funk et al. 2004). Untersuchungen zum zellulären Ausbreitungsmechanismus des DHBV sprechen dafür, dass die Ausbreitung der Nachkommenviren lokal an die Nachbarzellen erfolgt. Es werden aber auch teilweise Viren in das Kulturmedium abgegeben, die weiter entfernt liegende Zellen infizieren können (Funk et al. 2004).

Für die vorliegenden Untersuchungen mussten die Versuchsbedingungen so gewählt werden, dass die Hepatozytenkulturen optimal empfänglich für die Virusreplikation waren. Entscheidend war die Zeitspanne zwischen Aussaat der Zellen und Beimpfung. Sauerbrei et al. (2005) konnten zeigen, dass mit einem Anteil von 40% die höchste Anzahl infizierter Zellen erzielt wird, wenn die Beimpfung der Zellkulturen 4 Tage nach der Einsaat vorgenommen wurde. Erfolgte die Beimpfung nach dem 6. Tag der Zellkultivierung traten keine Infektionsherde mehr auf. Erklärung findet die zeitlich begrenzte Empfänglichkeit der Hepatozyten einerseits mit der Stimulierung des Typ I-Interferonsystems als Folge der in vitro-Präparation der Hepatozyten, die die Virusreplikation während der ersten 2-3 Tage hemmt (Lavine und Genam 1993; Schultz und Chirasi 1999). Andererseits verlieren kultivierte Hepatozyten ihre

Empfänglichkeit für DHBV nach dem 5. Tag p.i. (Sauerbrei et al. 2005, Tuttleman et al. 1986b, Galle et al. 1989). Ursache ist wahrscheinlich die Entdifferenzierung der Hepatozyten oder der Verlust der zellulären Rezeptoren für die Anhaftung der Viren.

Um primäre Hepatozytenkulturen bei Bedarf herstellen zu können, müssten Enteneier kommerziell ganzjährig verfügbar sein. Das Aufkommen befruchteter Enteneier unterliegt aber bekanntlich natürlichen Schwankungen, so dass es nicht an Versuchen gefehlt hat, durch Kryokonservierung einen Zellvorrat zu schaffen (Wang 2002b). Umfangreiche Untersuchungen zu dieser Problematik wurden von Schacke et al. (2009) durchgeführt. Die Autoren entwickelten eine Methode, bei der durch den Gefrier- und Tauprozess die Empfänglichkeit der Zellen für DHBV nicht wesentlich reduziert wurde. Inwieweit sich diese kryokonservierten Zellen für Desinfektionsversuche eignen, müssen entsprechende Untersuchungen noch zeigen. Um das In vitro-DHBV-Hepatozyten-System abschließend zu bewerten, wurden in Tabelle 18 die Vor- und Nachteile der Methode gegenübergestellt.

Tab. 18: Vor- und Nachteile des DHBV-Infektionsmodells

Vorteile	Nachteile
Gut etablierte Methode zur Gewinnung primärer Hepatozyten aus embryonierten Eiern der Peking-Ente	Erfordert die Haltung DHBV-freier Peking-Enten bzw. die Selektion DHBV-freier Peking-Enten bei Verwendung kommerziell erhältlicher Eier
Erzielung hoher Virustiter in der Hepatozyten-Kultur	Als Virusquelle sind Seren von DHBV-positiven Enten notwendig,
DHBV und HBV haben viele gemeinsame physikalische Eigenschaften	Zwischen DHBV und HBV gibt es nur wenige Sequenzhomologien , DHBV besitzt im Unterschied zum HBV Lysin-Seitenketten auf der Hülle, HBV hat mehr Disulfidbrücken zwischen Hüllproteinen als DHBV
Bestimmung der Infektiosität durch Nachweis DHBV-spezifischer Oberflächen-Proteine (DHBs-Ag)	Keine Bestimmung der Infektiosität auf der Grundlage virusbedingter zytopathischer Effekte
Virusinaktivierungskinetik ist vergleichbar mit Schimpansenversuchen	Ergebnisse können nicht mit absoluter Sicherheit auf HBV übertragen werden
Keine Infektionsgefahr für den Menschen	DHBV ist kein für den Menschen klinisch relevantes Virus
Keine Anzeigepflicht laut Tierschutzgesetz	Jahreszeitlich unterschiedliche Verfügbarkeit von Peking-Enteneiern

Stabilität von Duck Hepatitis B Virus und Vacciniavirus/Modified Vacciniavirus Ankara gegenüber Desinfektionsmitteln

In der Leitlinie der DVV und des RKI zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin (Blümel et al. 2008) ist das Vacciniavirus, Stamm Elstree als Testvirus aufgeführt. In der Leitlinie wird auch darauf hingewiesen, dass Beschäftigte, die Versuche mit diesem Virus durchführen, entsprechend geimpft sein sollten. Diese Vorsichtsmaßnahme war in Anbetracht der wiederholt beschriebenen Laborinfektionen mit Vacciniavirus getroffen worden (MacNeil et al. 2009). Nach der Einstellung der Pockenschutzimpfung im Jahre 1975 besteht insbesondere bei jüngeren Labormitarbeiter/innen oftmals kein bzw. kein ausreichender Immunschutz. Bei ungeimpften Personen können bei artifizieller Infektion die nach Pockenschutzimpfung bekannten Komplikationen wie z.B. Vacciniakeratitis, generalisierte Infektionen oder Enzephalitis auftreten. Im Schrifttum finden sich immer wieder Berichte über Vacciniavirusinfektionen bei Laborarbeiten. So wurden in den USA zwischen 2005 und 2007 fünf Laborinfektionen registriert (MacNeil et al. 2009).

Zur Verbesserung der Sicherheit von Labormitarbeitern wurde vom Fachausschuss Virusdesinfektion der DVV am 1. September 2010 der Austausch von Vacciniavirus Stamm Elstree gegen das stark in seiner Virulenz abgeschwächte MVA als Modellvirus im Rahmen der Viruzidieprüfung beschlossen (DVV 2011). Nach Mitteilung der DVV vom 1.9.2011 endet die Übergangsfrist, während der Versuche mit Vacciniavirus noch für Zertifizierungsverfahren von Desinfektionsmitteln akzeptiert werden, im September 2014. Die Verwendung als Testvirus setzt voraus, das MVA eine mit Vacciniavirus vergleichbare Empfindlichkeit gegen Desinfektionsmittel besitzt.

Das Vacciniavirus gehört zum Genus der Orthopoxviren, die bei zahlreichen Spezies vorkommen. Pockenviren sind umhüllt und haben in der elektronenmikroskopischen Darstellung quaderförmige Gestalt. Mit ~300–350 nm × 140–170 nm gehören sie zu den größten Viren. Die einzelnen Vertreter sind morphologisch mit dem Elektronenmikroskop nicht voneinander zu unterscheiden (Biel und Gelderblom 1999). Die Viruspartikel verfügen über eine Vielzahl von Enzymen und replizieren sich im Zytoplasma der Wirtszelle. Im Unterschied zu DHBV kann Vacciniavirus in

verschiedenen Zellkulturlinien vermehrt werden, wobei hohe Virustiter erreicht werden. Das Vacciniavirus bildet als zytopathogenes Virus deutlich sichtbare Veränderungen im Zellrasen aus, so dass zur Bestimmung der Infektiosität die Auswertung mikroskopisch an der vitalen Zellkultur vorgenommen werden kann. Da jede infizierte Zelle ungefähr 10.000 neue Viruspartikel bildet, können in Zellkulturen problemlos solch hohe Virustiter erzielt werden, die Desinfektionsversuche ermöglichen. Gegen Umwelteinflüsse ist das Vacciniavirus sehr stabil (Essbauer et al. 2007). Die Herkunft des Vacciniavirus ist unklar. Wahrscheinlich wurde das Virus ursprünglich aus infizierten Kühen isoliert. Um die Wirkung als Impfstoff zu verstärken, wurde es später zusätzlich mit Isolaten aus infizierten Pferden gemischt (Moss 1991).

Das MVA geht auf einen Vacciniavirus-Stamm zurück, der in der Türkei jahrelang über Esel-Kalb-Esel-Passagen gehalten wurde (Mayr et al. 1975). Zur Abschwächung der relativ hohen Virulenz wurde dieses Impfvirus in mehr als 570 Passagen auf primären Hühnerfibroblastenzellen (Mayr et al. 1978) attenuiert und in der Endphase der Pockeneradikation als Impfvirus eingesetzt. MVA unterscheidet sich vom Vacciniavirus durch zahlreiche Mutationen, die mit 6 Gendelektionen und einem deutlich eingeschränkten Wirtsbereich einhergehen. Eine produktive Replikation des MVA ist bislang nur in Hühnerfibroblasten und der Hamsterzelllinie BHK-21 möglich. In menschlichen Zellen vermehrt es sich nur mäßig (Carroll und Moss 1997, Drexler et al. 1998), und es werden keine normal strukturierten Virionen gebildet (Gallego-Gomejz et al. 2003). In einer Reihe von Tierexperimenten, einschließlich immunsupprimierten Tieren, stellte sich MVA als avirulent heraus. Auch bei klinischen Anwendungen von MVA als Impfstoff an über 150.000 Personen konnten keine signifikanten Nebenwirkungen festgestellt werden (Bundesamt für Verbraucherschutz 2002). Heute ist MVA ein vielversprechender Kandidat als Vektor für rekombinante Impfstoffe (Sutter und Staib 2003).

Da sich Vacciniavirus und MVA deutlich in ihren biologischen Eigenschaften unterscheiden, waren umfangreiche Voruntersuchungen zur Desinfektionsmittelprüfung durchgeführt worden. Die Frage der Eignung von MVA als Testvirus für die Bestimmung der begrenzten Viruzidie von Desinfektionsmittel wurde zunächst nach den für die Veterinärmedizin geltenden Vorschriften untersucht (Hartnack et al. 2008). In diesen Versuchen wurden von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft gelistete kommerzielle Desinfektionsmittel auf

der Basis verschiedener Wirkstoffe, wie organischen Säuren, Aldehyden, Halogenen und aktivem Sauerstoff, getestet. Die Prüfungen erfolgten sowohl im quantitativen Suspensionstest mit und ohne Proteinzusatz als auch im qualitativen Carriertest bei Einwirkungszeiten von 15 bis 120 min. Die Autoren konnten keine signifikanten Unterschiede in der antiviralen Aktivität der geprüften Desinfektionsmittel feststellen.

Von Rabenau et al. (2010) wurden die fünf in der vorliegenden Arbeit gegen DHBV getesteten Wirkstoffe Ethanol, Isopropanol, Peressigsäure, Glutardialdehyd und Formaldehyd parallel an Vacciniavirus und MVA entsprechend der DVV/RKI–Leitlinie (Blümel 2008) für Desinfektionsmittelprüfungen im Suspensionsversuch mit Proteinlast in verschiedenen Laboratorien getestet. In die statistische Berechnung flossen die Ergebnisse von 3 Laboratorien ein. Die Befunde zeigten, dass marginale Unterschiede in der Sensitivität von Vacciniavirus und MVA bestehen, die nach Ansicht der Autoren nicht dagegen sprechen, zukünftig MVA als Modellvirus anstelle von Vacciniavirus einzusetzen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden mit Resultaten verglichen, die in der vorliegenden Arbeit für DHBV ermittelt wurden. Bei der tabellarischen Gegenüberstellung der Ergebnisse in Tabelle 19 wurden nur die Konzentrationen und Einwirkzeiten erfasst, bei der mit dem jeweiligen Desinfektionsmittel der für Wirksamkeit sprechende mRF von $\geq 4,00 \log_{10}$ erreicht wurde.

Im Grenzbereich von unwirksam zu wirksam verhielten sich die Modellviren Vacciniavirus, MVA und DHBV uneinheitlich. Bei Ethanol führte die Verlängerung der Einwirkzeit von 1 min auf 2 min bereits zur Angleichung der Testergebnisse. Die Erhöhung der Isopropanol-Konzentration von 30% auf 40% und der Peressigsäure von 0,005% auf 0,01% hatte denselben Effekt. Die größten Unterschiede zeigten sich bei Glutardialdehyd. Trotz Erhöhung der Konzentration von 0,05% auf 0,1% und Verlängerung der Einwirkzeit auf 5 min war die Substanz gegenüber MVA unwirksam. Demgegenüber wurden bereits bei der niedrigsten Konzentration von 0,05% innerhalb von 1 min die Titer von DHBV und Vacciniavirus um $4,00 \log_{10}$ -Stufen reduziert. Ob sich darin Unterschiede in der Tenazität der Viren widerspiegeln, ist fraglich. Rabenau et al. (2010) weisen darauf hin, dass bereits geringste Schwankungen der Versuchsbedingungen die Ergebnisse beeinflussen können, wenn, wie in den vorliegenden Untersuchungen zur Erfassung der Inaktivierungskinetik im Grenzbereich zwischen wirksam und unwirksam, getestet wird.

Tab. 19: Bewertung der getesteten Desinfektionsmittel als wirksam (+) oder unwirksam (Ø) in Bezug auf die vollständige Inaktivierung* von DHBV, Vacciniavirus und MVA. Angegeben wurde die niedrigste wirksame Konzentration und kürzeste Einwirkzeit für jedes Testvirus.

Desinfektionsmittel	Einwirkzeit (min)	Mittlerer Reduktionsfaktor ≥4,00 log ₁₀ TCID ₅₀		
		DHBV	Vacciniavirus	MVA
Ethanol 40%	1 min	+	Ø	Ø
	2 min	+	+	+
Isopropanol 30%	2 min	+	Ø	Ø
40%	1 min	+	+	+
Peressigsäure 0,005%	1 min	Ø	+	+
0,01%	2 min	+	+	+
Formaldehyd 0,7%	60 min	Ø	Ø	Ø
Glutardialdehyd 0,05%	2 min	+	+	Ø
0,1%	5 min	+	+	Ø

* vollständige Inaktivierung (99,99%) mRF ≥4,00 log₁₀

+ mRF von ≥4,00 log₁₀ wurde erreicht

Ø mRF von ≥4,00 log₁₀ wurde nicht erreicht

Beim Vergleich der Versuchsreihen mit Vacciniavirus/MVA und DHBV ist zu berücksichtigen, dass die Untersuchungen in verschiedenen Laboratorien durchgeführt wurden. Die strikte Einhaltung der Versuchsprotokolle gemäß DVV/RKI-Richtlinie (Blümel et al. 2008) und der Bezug der Stammlösungen der Desinfektionsmittel von einem unabhängigen Lieferanten haben zwar für weitgehend identische Versuchsbedingungen gesorgt, ein minimaler Einfluss auf die Testergebnisse ist jedoch nicht auszuschließen. Die Aussagekraft der Untersuchungen wird davon jedoch nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse lassen insgesamt den Schluss zu, dass die umhüllten Modellviren DHBV und Vacciniavirus/MVA eine vergleichbare Tenazität aufweisen. Desinfektionsmittel, die gegen Vacciniavirus/MVA wirksam sind, inaktivieren auch zuverlässig DHBV. Geringe Unterschiede finden sich in niedrigen Konzentrationsbereichen, die in der Praxis keine Anwendung finden. Das bedeutet, dass die Überprüfung von Desinfektionsmitteln gegen DHBV nicht erforderlich ist, wenn die Testungen Vacciniavirus oder MVA als Modellviren einschließen.

6. Schlussfolgerungen

- Trotz der hohen Hygienestandards in modernen Gesundheitssystemen sind nosokomiale Virusinfektionen ein ernsthaftes Problem.
- Wirksame Desinfektionsmittel zur Hände-, Oberflächen- und Instrumentendesinfektion tragen entscheidend zur Unterbrechung von Infektketten in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen bei.
- Viren haben eine sehr unterschiedliche Stabilität gegenüber Desinfektionsmitteln, so dass eine Testung der Präparate auf Viruzidie durch in Leitlinien festgelegte Bedingungen vorgenommen werden muss.
- Wegen der Vielzahl humanpathogener Viren ist es nicht möglich, die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen die einzelnen Krankheitserreger direkt zu prüfen, so dass Modellviren mit charakteristischen Eigenschaften verwendet werden.
- In Deutschland werden Desinfektionsmittel für den Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“ an Modellviren getestet. Modellvirus für Hepatitis B-Virus (HBV) ist Vacciniavirus, Stamm Elstree bzw. die stärker attenuierte Variante „Modified Vaccinia Virus Ankara“ (MVA).
- International anerkannt ist das Duck Hepatitis B Virus (DHBV) als Surrogatvirus zur Prüfung von Desinfektionsmitteln gegenüber HBV.
- Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass der quantitative Suspensionsversuch nach den vorgeschriebenen Leitlinien geeignet ist, die Chemoresistenz des DHBV gegenüber Desinfektionsmitteln zu bestimmen.
- Desinfektionsmitteltestungen auf der Basis des DHBV sind methodisch anspruchsvoll und aufwendiger als die Untersuchungen mit Vacciniavirus/MVA.
- DHBV und Vacciniavirus/MVA haben eine vergleichbare Stabilität gegenüber Ethanol, Isopropanol, Peressigsäure und Glutardialdehyd sowie Formaldehyd.
- Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse ist die routinemäßige Testung des DHBV zur Prüfung von Desinfektionsmitteln mit dem Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“ nicht erforderlich.

7. Literatur

Anonym. 1982. Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. Bundesgesundheitsblatt. 25: 397-98.

Anonym. 2005. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 48:1420–26.

Anonym. 2007. DIN EN 14476:2007-02. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch Viruzidie für in der Humanmedizin verwendete Desinfektionsmittel und Antiseptika – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1). Beuth, Berlin Wien Zürich

Arbeitskreis Blut. 2000. Hepatitis B-Virus (HBV). Bundesgesundheitsbl, 43:240-48.

Arbeitskreis Viruzidie. 2004. Prüfung und Deklaration der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren. Stellungnahme des Arbeitskreises Viruzidie beim Robert Koch-Institut (RKI) sowie des Fachausschusses "Virusdesinfektion" der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und der Desinfektionsmittelkommission der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Bundesgesundheitsbl, 47:62-66.

Biel SS, Gelderblom HR. 1999. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. J Clin Virol, 13(1-2):105-19.

Block SS. 1991. Peroxygen compounds. In: Block SS (ed) Desinfection, Sterilization and Perservation. 4th ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 167-181

Blumberg BS. 1981. Viruses similar to hepatitis B virus (Icrons). Hum Pathol, 12(12):1107-13.

Blümel J, Glebe D, Neumann-Haefelin D, Rabenau HF, Rapp I, von Rheinbaben F, Ruf B, Sauerbrei A, Schwebke I, Steinmann J, Willkommen H, Wolff MH, Wutzler P. 2008. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin. Fassung vom 1. August 2008. Bundesgesundheitsbl, 51: 937-41.

Bond, WX V., Favero MS, Petersen, Ebert J W. 1983. Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high-level disinfectant chemicals. J Clin Microbiol, 18:535-38.

Bundesamt für Verbraucherschutz. 2002. Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des rekombinanten Vacciniavirus MVA

http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/09_Viren/Vacciniavirus_MVA.pdf;jsessionid=D0CAFBA807097714BB94A035A01002E8.1_cid322?_blob=publicationFile&v=5

(letzter Zugriff 28.08.2013)

Carroll MW, Moss B. 1997. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of Vaccinia Virus propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. Virology 238, 198–211.

Chaufour X, Deva AK, Vickery K, Zou J, Kumaradeva P, White GH, Cossart YE. 1999. Evaluation of disinfection and sterilization of reusable angioscopes with the duck hepatitis B model. J Vasc Surg, 30:277-82.

Condreay L D, Aldrich C E, Coates L, Mason W S, Wu, T. T. 1990. Efficient duck hepatitis B virus production by an avian liver tumor cell line. J Virol 64, 3249–58.

Deva AK, Vickery K, Zou J, West RH, Harris JP, Cossart YE. 1996. Establishment of an in-use testing method for evaluating disinfection of surgical instruments using the duck hepatitis B model. J Hosp Infect, 33(2):119-30.

Drexler I, Heller K, Wahren B, Erfle V, Sutter G. 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. J Gen Virol 79: 347–52.

DVV. 2011. Aktualisierung des Beschlusses des Fachausschusses

Virusdesinfektion der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten

e.V. (DVV) vom 1. September 2010 zum Austausch von Vacciniavirus, Stamm

Elstree gegen MVA (Modifiziertes Vacciniavirus Ankara) als Testvirus im Rahmen der Viruzidieprüfung entsprechend der DVV / RKI-Leitlinie in der Fassung vom

01.08.2008

<http://www.dvv-ev.de/news/Austausch%20von%20Vacciniavirus%2015%208%202010.pdf> (letzter Zugriff 28.08.2013)

DVV. 2013. Memorandum zur Verwendung von Molekularsiebfiltrations-Säulen in der Desinfektionsmittelprüfung (Stand: 18. Mai 2013).

<http://www.dvv-ev.de/news/Memorandum%20final%20deutsch%20Ueberarbeitung%2017%2005%202013231.pdf> (letzter Zugriff 28.08.2013)

Eble BE, Corash L. 1996. Photochemical inactivation of duck hepatitis B virus in human platelet concentrates: a model of surrogate human hepatitis B virus infectivity. *Transfusion*, 36(5):406-18.

Environmental Protection Agency. 2000. Protocol for testing the efficacy of disinfectants used to inactivate duck hepatitis virus and to support corresponding label claims. http://www.epa.gov/oppad001/pdf_files/hbvprotocol.pdf (letzter Zugriff 28.08.2013)

Essbauer S, Meyer H, Porsch-Ozcurumez M, Pfeffer M. 2007. Long-lasting stability of vaccinia virus (orthopoxvirus) in food and environmental samples. *Zoonoses Public Health* 54, 118–24.

Favero MS, Bolyard EA. 1995. Microbiologic considerations. Disinfection and sterilization strategies and the potential for airborne transmission of bloodborne pathogens. *Surg Clin North Am*, 75(6):1071-89.

Frösner G, Jentsch G, Uthemann H. 1982. Zerstörung der Antigenität und Beeinflussung der immunochemischen Reaktivität von Antigenen des Hepatitis B Virus (HBsAg, HBcAg und HBeAg) durch Desinfektionsmittel – ein Prüfmodell. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B*, 176(1):1-14.

Frühwirth M, Heininger U, Ehlken B, Petersen G, Laubereau B, Moll-Schüler I, Mutz I, Forster J. 2001. International variation in disease burden of rotavirus gastroenteritis in children with community- and nosocomially acquired infection. *Pediatr Infect Dis J*, 20(8):784-91.

Funk A, Mhamdi M, Lin L, Will H, Sirma H. 2004. Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry. *J Virol*, 78(15): 8289-300.

Galle PR., Schlicht HJ, Kuhn C, Schaller H. 1989. Replication of duck hepatitis B virus in primary duck hepatocytes and its dependence on the state of differentiation of the host cell. *Hepatology* 10, 459–65.

Gallego-Gomez J C, Risco C, Rodriguez D, Cabezas P, Guerra S, Carrascosa JL, Esteban M. 2003. Differences in virus- induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J Virol* 77, 10606–22.

Gawellek S. 2004. Molekulare Charakterisierung des Varicella-Zoster-Virus und Unterscheidung vom Impfstamm Oka [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

<http://www.db-thueringen.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-7522/Gawellek/Promotion.pdf>. (letzter Zugriff 28.08.2013)

Gastmeier P, Kampf G, Wischnewski N, Hauer T, Schulgen G, Schumacher M, Daschner F, Rüden H. 1998. Prevalence of nosocomial infections in representative German hospitals. J Hosp Infect, 38(1):37-49.

Gerlich W, 1991. Hepatitis B surface proteins. J Hepatol 13(Suppl 4):90-2.

Gerlich WH, Schaefer S. 2002. Hepadnaviren: Hepatitis B Virus: Doerr HW und Gerlich WH (Hrsg), Medizinische Virologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 191-210.

Gerlich WH, Glebe D. 2004. Methods for validation of hepatitis B virus inactivation. In: PDE/EMEA European virus safety forum Vol. 118, Robertson J (ed.) Dev Biol., Vol. 118, , Karger, Basel, 112-22.

Gerlich WH, Dieter Glebe D, Schüttler CG. 2012. Infektiosität des Hepatitis-B-Virus Hepatitis & more.

<http://www.hepatitisandmore.de/archiv/2012-1/infektiositaet-des-hepatitis-b-virus.shtml> (letzter Zugriff 28.08.2013)

Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop EV, Valerius KP, Gerlich WH. 2003. Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. J Virol, 77(17):9511-21.

Gottsch JD.1996. Surveillance and control of epidemic keratoconjunctivitis. Trans Am Ophthalmol Soc, 94:539-87.

Gregersen JP, Roth B. 2012. Inactivation of stable viruses in cell culture facilities by peracetic acid fogging. Biologicals, 40(4):282-87.

Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, Guguen-Guillouzo C. 1988. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. J Virol 62, 4136–43.

Gripon P, Rumin S, Urban S, Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(24):15655-60

Hartnack S, Essbauer S, Truyen U. 2008. Substitution of vaccinia virus Elstree by modified vaccinia virus Ankara to test the virucidal efficacy of chemical disinfectants. Zoonoses Public Health 55 (2): 99-105.

Hilfenhaus J, Gröner A, Nowak T, Weimer T. 1997. Analysis of human plasma products: polymerase chain reaction does not discriminate between live and inactivated viruses. *Transfusion*, 37(9):935-40.

Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, Weber-Schehl M, Brixner V, Busch MP, Geusendam G, Gubbe K, Mahnhardt C, Mayr-Wohlfart U, Pichl L, Roth WK, Schmidt M, Seifried E, Wright DJ. 2008. German Red Cross NAT Study Group. Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion*. 48(8):1558-66.

Howard CR, Dixon J, Young P, van Eerd P, Schellekens H. 1983. Chemical inactivation of hepatitis B virus: the effect of disinfectants on virus-associated DNA polymerase activity, morphology and infectivity. *J Virol Methods*, 7(3):135-48.

Jilbert AR, Freiman JS, Burrell CJ, Holmes M, Gowans EJ, Rowland R, Hall P, Cossart YE. 1988. Virus-liver cell interactions in duck hepatitis B virus infection. A study of virus dissemination within the liver. *Gastroenterology*, 95(5):1375-82.

Jülich W-D, Kramer A, Reinholz D, Höppe H, Manigk W, Nordheim W, Bräuninger S. 1990. Vergleichende Untersuchungen verschiedener Methoden zur Erfassung der Wirkungsbeeinträchtigung von Desinfektionsmitteln durch Blut. *Hyg Med*, 15:357-61.

Jülich W, v Rheinhaben F, Steinmann J, Kramer A. 1993. Zur viruziden Wirksamkeit chemischer und physikalischer Desinfektionsmittel und -verfahren. *Hyg Med*, 18:303-24.

Jursch CA, Gerlich WH, Glebe D, Schaefer S, Marie O, Thraenhardt O. 2002. Molecular approaches to validate disinfectants against human hepatitis B virus. *Med. Microbiol. Immunol*, 190:189-97.

Kaerber G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Path Pharmacol*, 162:480-83.

Klein M, Deforrest A. 1963. Antiviral action of germicides. *Soap Chem Spec*, 39:95-97.

Köck J, Nassal M, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE, von Weizsacker F. 2001. Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol*, 75: 5084–89.

Lanini S, Puro V, Lauria FN, Fusco FM, Nisii C, Ippolito G. 2009. Patient to patient transmission of hepatitis B virus: a systematic review of reports on outbreaks between 1992 and 2007. *BMC Med*, 8;7:15.

- Larson ET**, Morton HE. 1991. Alcohols. In: Block SS (ed) *Disinfection, Sterilisation and Preservation*. 4th ed. Lea & Febiger. Philadelphia, 191-203.
- Lavine JE**, Ganem D. 1993. Inhibition of duck hepatitis B virus replication by interferon-gamma, *J Med Virol*, 40(1):59-64.
- Lopman BA**, Adak GK, Reacher MH, Brown DW. 2003. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis*, 9(1):71-7.
- Lopman BA**, Reacher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halladay T, Brown DW, Edmunds WJ, Sarangi J. 2004. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002–2003. *Emerg Infect Dis*, 10(10):1827–34.
- Lopman BA**, Andrews N, Sarangi J, Vipond IB, Brown DW, Reacher MH. 2005. Institutional risk factors for outbreak of nosocomial gastroenteritis: survival analysis of a cohort of hospital units in South-west England, 2002-2003. *J Hosp Infect*, 60(2):135-43.
- MacNeil, A**, Reynolds, MG, and Damon, IK. 2009. Risks associated with vaccinia virus in the laboratory. *Virology*, 385:1-4.
- Madge P**, Paton JY, McColl JH, Mackie PL. 1992. Prospective controlled study of four infection-control procedures to prevent nosocomial infection with respiratory syncytial virus. *Lancet*, 340:1079-83.
- Malik YS**, Maherchandani S, Goyal SM. 2006. Comparative efficacy of ethanol and isopropanol against feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Am J Infect Control*, 34(1):31-5.
- Maniatis T**, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring harbour Laboratory, New York.
- Marion PL**, Cullen JM, Azcárraga RR, Van Davelaar MJ, Robinson WS. 1987. Experimental transmission of duck hepatitis B virus to Pekin ducks and to domestic geese. *Hepatology*, 7(4):724-31.
- Mason WS**, Halpern MS, England JM, Seal G, Egan J, Coates L, Aldrich C, Summers J. 1983. Experimental transmission of duck hepatitis B virus. *Virology*, 131(2):375-84.
- Mayr A**, Hochstein-Mintzel V, Stickl H. 1975. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection*, 3(1):6-14.

- Mayr A**, Stickl H, Müller HK, Danner K, Singer H. 1978. Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus. Zentralbl Bakteriologie B, 167(5-6):375–90.
- Meakins SM**, Adak GK, Lopman BA, O'Brien SJ. 2003. General outbreaks of infectious intestinal disease (IID) in hospitals, England and Wales, 1992-2000. J Hosp Infect, 53(1):1-5.
- Mlinaric-Galinovic G**, Varda-Brkic D. 2000. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. Diagn Microbiol Infect Dis, 37(4):237-46.
- Moss B**, Ahn BY, Amegadzie B, Gershon PD, Keck JG. 1991. Cytoplasmic transcription system encoded by vaccinia virus. J Biol Chem, 266:1355-58.
- Mücke M**. 1973. Zur Bestimmung und zu Spurennachweis von Peressigsäure in Gegenwart von Wasserstoffperoxid für die Praxis der Kaltsterilisation und Desinfektion. Z Med Labortechnik, 14:319-323.
- Mücke H**. 1985. Die Anwendung von Peressigsäure. Z Ärztl Fortbild (Jena), 79(6):259-62.
- Mukerjee A**. 1994. Spread of influenza: a study of risk factors in homes for the elderly in Wales. J Epidemiol Community Health, 48(6):602-3.
- Murray SM**, Freiman JS, Vickery K, Lim D, Cossart YE, Whiteley RK. 1991. Duck hepatitis B virus: a model to assess efficacy of disinfectants against hepadnavirus infectivity. Epidemiol Infect, 106(3):435-43.
- Offergeld R**. 2006. Durch Blut übertragbare Infektionen – Aktueller Kenntnisstand, aktuelle Datenlage. Anästhesiologie und Intensivmedizin ; 47: 100-4.
- Ogilvie I**, Khoury H, Goetghebuer MM, El Khoury AC, Giaquinto C. 2012. Burden of community-acquired and nosocomial rotavirus gastroenteritis in the pediatric population of Western Europe: a scoping review. BMC Infect Dis, 19;12:62.
- Payan C**, Cottin J, Lemarie C, Ramont C. 2001. Inactivation of hepatitis B virus in plasma by hospital in-use chemical disinfectants assessed by a modified HepG2 cell culture. J Hosp Infect; 47: 282-87.
- Permana PA**, Snapka RM. 1994. Aldehyde-induced protein-DNA crosslinks disrupt specific stages of SV40 DNA replication. Carcinogenesis, 15(5):1031-6.
- Perz JF**, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. J Hepatol, 45(4):529-38.

Prince HN, Prince, DL Prince RN. 1991. Principles of viral control and transmission, In: Block SS (ed.) Disinfection, Sterilisation and Preservation. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 411-44

Prince DL, Prince HN, Thraenhart O, Muchmore E, Bonder E, Pugh J. 1993. Methodological approaches to disinfection of human hepatitis B virus. J Clin Microbiol, 31(12):3296-304

Protzer U, Nassal M, Chiang PW, Kirschfink M, Schaller H. 1999. Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. Proc Natl Acad Sci USA, 96:10818–23.

Pugh, JC, Ijaz MK, Suchmann DB. 1999. Use of surrogate models for testing efficacy of disinfectants against hepatitis B virus. Amer J Infect Control, 27:375-76.

Rabenau HF, Schwebke I. 2010. Hygiene und Desinfektion zur Bekämpfung von Viren. In: Doerr HW, Gerlich WH (Hrsg.) Lehrbuch der Medizinischen Virologie. 2.Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 168-190

Rabenau HF, Rapp I, Steinmann J. 2010. Can vaccinia virus be replaced by MVA virus for testing virucidal activity of chemical disinfectants?. BMC infectious Diseases, 10: 185

Rabenau HF, Schwebke I, Steinmann J, Eggers M, Rapp I, Neumann-Haefelin D und die Mitglieder des Fachausschuss Virusdesinfektion. 2012. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. zur quantitativen Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf nicht-porösen Oberflächen (Anwendung im Bereich Humanmedizin). Hyg Med 37(3): 78-85.

Rheinbaben F v, Wolff MH. 1991. Anmerkung zu Stabilität und chemischen Desinfektion von Viren. Lab Med, 15:327-35.

Rheinbaben F v, Wolff MH. 2002 Handbuch der Virusdesinfektion. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo

RKI. 2012a. Deutsche Daten im Rahmen der ersten europäischen Prävalenzerhebung zum Vorkommen nosokomialer Infektionen und zur Antibiotikaaanwendung. Epidem Bull 26: 239-40.

RKI. 2012b. Ratgeber für Ärzte. Hepatitis B. Epidem Bull 1:1-8.

Sauerbrei A, Sehr K, Eichhorn U, Reimer K, Wutzler P. 2004. Inactivation of human adenovirus genome by different groups of disinfectants. J Hosp Infect, 57(1):67-72.

- Sauerbrei A**, Schacke M, Schultz U, Egerer R, Merkle I, Glebe D, Gerlich W, Wutzler P. 2005. Alternative methods for validation of cell culture infection with duck hepatitis B virus. *J Virol Methods*, 129(2):178-85.
- Sauerbrei A**, Schacke M, Glück B, Egerer R, Wutzler P. 2006. Validation of biocides against duck hepatitis B virus as a surrogate virus for human hepatitis B virus. *J Hosp Infect*, 64(4):358-65.
- Schacke M**, Glück B, Wutzler P, Sauerbrei A. 2009. In vitro cultivation and cryopreservation of duck embryonic hepatocytes. *J Virol Methods*, 157(1):25-31.
- Schwebke I**, Rabenau HF. 2012. Aktueller Stand zur Viruzidieprüfung - ein Überblick, *Hygiene & Medizin*, 37(7/8): 291-95.
- Schultz U**, Chisari FV. 1999. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *J Virol*, 73(4):3162-8.
- Spearman C**. 1908. The method of "right and wrong cases" ("constant stimuli") without Gauss's formulae. *Br J Psychol*, 2:227-42.
- Sprössig M**, Mücke H. 1984. Das antivirale Regime – 25 Jahre Entwicklung und Erfahrung. In: Machmert RM et al. (Hrsg): Experimentelle und praktische Keimtötung. Schriftenreihe: Mikrobielle Umwelt und antimikrobielle Maßnahmen. Bd. 8. Leipzig: Barth, 98-100.
- Sprössig M**. 1989. Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten der Peressigsäure - 25 Jahre Erfahrung und Entwicklung. *Hyg Med*, 14:498-501.
- Stramer SL**, Wend U, Candotti D, Foster GA, Hollinger FB, Dodd RY, Allain JP, Gerlich W. 2011. Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors. *N Engl J Med*; 364(3): 236-47.
- Steuer W**, Lutz-Dettinger U. 1990. Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung. 6.Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Sutter G**., Staib C. 2003. Vaccinia vectors as candidate vaccines: The development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Target Infect. Disord*, 3:263-71.
- Thierfelder W**, Hellenbrand W, Meisel H, Schreier E, Dortsch R.v. 2001. Prevalence of markers for hepatitis A, B and C in the German population. Results of the German National Health Interview and Examination Survey 1998. *Eur J Epidemiol*, 17: 429-35.

- Thraenhart O**, Kuwert EK, Scheiermann N, Dermietzel R, Paar D, Maruhn D, Alberti A, Richter HJ, Hotz J. 1982. Comparison of the morphological alteration and disintegration test (MADT) and the chimpanzee infectivity test for determination of hepatitis B virucidal activity of chemical disinfectants. *Zentralbl Bakteriol Microbiol Hyg B*, 176(5-6):472-84.
- Tsiquaye KN**, Barnard J. 1993. Chemical disinfection of duck hepatitis B virus: a model for inactivation of infectivity of hepatitis B virus. *J Antimicrob Chemother* 32(2): 313-23.
- Tuttleman JS**, Pugh JC, Summers JW. 1986a. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J Virol*, 58(1):17-25.
- Tuttleman JS**, Pourcel C, Summers J. 1986b. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*, 47(3):451-60.
- Tyler R**, Ayliffe GA, Bradley C. 1990. Virucidal activity of disinfectants: studies with the poliovirus. *J Hosp Infect*, 15(4):339-45.
- Valot S**, Edert D, Le Faou A. 2000. A simple method for the in vitro study of the virucidal activity of disinfectants. *J Virol Methods*, 86(1):21-24.
- Walter E**, Keist R, Niederöst B, Pult I, Blum HE. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology*, 24(1):1-5.
- Wang S**, Fusaro G, Padmanabhan J, Chellappan SP. 2002a. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene*, 21:8388–96.
- Wang, S.**, Zhang, B. and Faller, D.V. 2002b. Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *Embo J.*, 21:3019–28.
- WHO**. (2013). Hepatitis B.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
 (letzter Zugriff 28.08.2013)
- Wolff MH**. 1992. Virusbedingte nosokomiale Infektionen. *Hyg Med*, 17:305-12.
- Wright SA**, Bieluch VM. 1993. Selected nosocomial viral infections. *Heart Lung*, 22(2):183-7.
- Wutzler P**, Sprössig M, Peterseim H. 1975. Suitability of peracetic acid for sterilization of media for mycoplasma cultures. *J Clin Microbiol*, 1(3):246-9.
- Wutzler P**, Sauerbrei A. 2000. Virucidal efficacy of a combination of 0,2 % peracetic acid and 80% (v/v) ethanol (PA-Aethanol) as a potential hand disinfectant. *J Hosp Infect*, 46(4): 304–8.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. P. Wutzler und Herr Prof. Dr. med. A. Sauerbrei,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bad Frankenhausen, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Uwe Bust
Wohnort: Ahornweg 16
06567 Bad Frankenhausen
Geburtstag: 11.11.1962
Geburtsort: Mühlhausen/Thür.

Schulbildung:

1969 - 1977 Käthe Kollwitz-Schule Dingelstädt
1977 - 1981 Erweiterte Oberschule Leinefelde, Abschluss Abitur

1981 - 1984 Wehrdienst

Studium:

1984 - 1986 Karl Marx Universität Leipzig
1986 - 1990 Medizinische Akademie Erfurt, Abschluss Ärztliche Prüfung
1990 Approbation

Beruf:

1990 – 2000 DRK Manniske Krankenhaus Bad Frankenhausen
1995 Martin Luther Universität Halle
1996 Facharzt Allgemeinchirurgie
seit 2000 DRK Krankenhaus Sömmerda
2002 Otto v. Guericke Universität Magdeburg
2004 Facharzt Viszeralchirurgie
2009 Facharzt Spez. Viszeralchirurgie

Danksagung

Bedanken möchte ich mich

besonders bei Herrn Prof. Dr. med. P. Wutzler, ehem. Direktor des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena, für die Überlassung des Themas, die fachliche Beratung sowie die vielen Ratschläge während der Themenbearbeitung,

bei Herrn Prof. Dr. med. A. Sauerbrei, Direktor des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena, für die Möglichkeit, den experimentellen Teil der Arbeit am Institut durchführen zu können sowie die fachliche Beratung und das Engagement während der Abfassung der Dissertation,

bei den Mitarbeitern des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. M. Schacke und Frau Rothmann, für die technischen Zuarbeiten und die fachliche Unterstützung.

Tabellenverzeichnis

Seite

Tab. 1:	Übersicht über humanmedizinisch relevante und bei Desinfektionsmaßnahmen potenziell zu berücksichtigende Viren (Arbeitskreis Viruzidie 2004)	8
Tab. 2:	Testviren für die Prüfung und Deklaration von Desinfektionsmitteln entsprechend der Leitlinie der DVV und des RKI zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin Fassung vom 1. August 2008 (Blümel et al. 2008)	15
Tab. 3:	Zusammenfassende Darstellung der getesteten Desinfektionsmittel nach Konzentrationen und Einwirkzeiten	25
Tab. 4:	Primer-Design zur Amplifikation von DHBV-DNA mittels PCR	29
Tab. 5:	Zeitlicher Verlauf der PCR	30
Tab. 6:	Zytotoxizität (cytotoxic dose 50% - CD ₅₀) von Ethanol, Isopropanol und Peressigsäure für primäre embryonale Entenhepatozyten	43
Tab. 7:	Zytotoxizität (cytotoxic dose 50% - CD ₅₀) von Formaldehyd und Glutardialdehyd für primäre embryonale Entenhepatozyten	44
Tab. 8:	Ergebnisse der Testung von Ethanol in Konzentrationen von 30 bis 70% und Einwirkzeiten von 1 bis 2 min gegenüber DHBV	47
Tab. 9:	Ergebnisse der Testung von Isopropanol in Konzentrationen von 20 bis 40% und Einwirkzeiten von 1 bis 2 min gegenüber DHBV	49
Tab. 10:	Ergebnisse der Testung von Peressigsäure in Konzentrationen von 0,001 bis 0,05% und Einwirkzeiten von 1 bis 2 min gegenüber DHBV	51
Tab. 11:	Ergebnisse der Testung von Formaldehyd in der Konzentration von 0,7% und Einwirkzeiten von 5 bis 60 min gegenüber DHBV	53
Tab. 12:	Ergebnisse der Testung von Glutardialdehyd in Konzentrationen von 0,05 und 0,1% und Einwirkzeiten von 0,5 bis 5 min gegenüber DHBV	55

Tab. 13:	Begrenzt viruzide Aktivität von Ethanol und Isopropanol gegenüber dem DHBV, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift	57
Tab. 14:	Begrenzt viruzide Aktivität von Peressigsäure gegenüber dem DHBV, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift	58
Tab. 15:	Begrenzt viruzide Aktivität von Formaldehyd und Glutardialdehyd gegenüber dem DHBV, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift	59
Tab. 16:	Begrenzt viruzide Aktivität von Ethanol, Isopropanol und Peressigsäure gegenüber dem Vacciniavirus bzw. dem MVA, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift (Rabenau et al. 2010)	61
Tab. 17:	Begrenzt viruzide Aktivität von Formaldehyd und Glutardialdehyd gegenüber dem Vacciniavirus bzw. dem MVA, Titerreduktion $\geq 4,00 \log_{10}$ in Fettschrift (Rabenau et al. 2010)	63
Tab. 18:	Vor- und Nachteile des DHBV-Infektionsmodells	77
Tab. 19:	Bewertung der getesteten Desinfektionsmittel als wirksam (+) oder unwirksam (Ø) in Bezug auf die vollständige Inaktivierung* von DHBV, Vacciniavirus und MVA. Angegeben wurde die niedrigste wirksame Konzentration und kürzeste Einwirkzeit für jedes Testvirus.	81

Abbildungsverzeichnis

Seite

Abb. 1:	Strukturformel von Formaldehyd	10
Abb. 2:	Strukturformel von Glutardialdehyd	10
Abb. 3:	Strukturformel von Ethanol	12
Abb. 4:	Strukturformel von Isopropanol	12
Abb. 5:	Strukturformel von Peressigsäure	13
Abb. 6:	Phylogenetischer Stammbaum der HBV-Genomtypen A-G (HBV-H nicht aufgeführt) des Menschen und der bekannten Hepadnaviren bei Tieren. Quelle: (Gerlich und Schaefer, 2002).	21
Abb. 7:	Primäre embryonale Entenhepatozyten 2 h nach Aussaat (Phasenkontrast, Originalvergrößerung 150x)	24
Abb. 8:	Ergebnisse der DHBV-PCR unter Verwendung von primären embryonalen Enten-Hepatozyten sowie des Plasmids pCD16 als Targets	32
Abb. 9:	Primäre embryonale Entenhepatozyten 3 Tage nach Aussaat (Phasenkontrast, Originalvergrößerung 100x)	34
Abb. 10:	Prinzip der indirekten Fluoreszenzantikörpertests	36
Abb. 11:	Fehlender Nachweis des DHBs-Ag in nicht infizierten primären embryonalen Enten-Hepatozyten als Negativkontrolle (Originalvergrößerung 125x), Quelle: Sauerbrei et al. 2006	37
Abb. 12:	Nachweis von DHBs-Ag in primären embryonalen Entenhepatozyten 6 Tage nach Infektion von 10^2 TCID ₅₀ DHBV vom Serum kongenital infizierter Peking-Enten (Originalvergrößerung 125x). Quelle: Sauerbrei et al. 2006	37
Abb. 13:	Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von Ethanol gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA	65
Abb. 14:	Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von Isopropanol gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA	66
Abb. 15:	Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von Peressigsäure gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA	67
Abb. 16:	Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von Formaldehyd gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA	68

Abb. 17: Vergleich der begrenzt viruziden Wirkung von
Glutardialdehyd gegenüber DHBV, Vacciniavirus und MVA

69